

# **CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DEL INTESTINO**

**ESPIRAL DE *MUSTELUS MENTO* COPE 1877**

**(CARCHARHINIFORMES, TRIAKIDAE)**



**TESIS**

**Para optar al título profesional de Biólogo Marino**

**UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO**

**FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR**

**CARRERA DE BIOLOGÍA MARINA**

**FRANCISCO JAVIER CONCHA TORO**

**2004**

**FRANCISCO JAVIER CONCHA TORO**

**Esta Tesis ha sido aprobada por la Comisión de Tesis en agosto de 2004**

**Dra. Gloria Ruiz Muñoz**

**Directora de Tesis**

**Dr. Juan Carvajal Garay**

**Prof. Fernando Balbontín**

## Tabla de contenido

**Página**

**Aprobación**

**Tabla de contenidos**

**I. Resumen**

**vi**

**II. Lista de Figuras**

**viii**

**Dedicatoria**

**xi**

**Agradecimientos**

**xii**

**1. Introducción**

**1**

1.1. Aspectos generales de clasificación

1

1.2. Antecedentes generales sobre el sistema digestivo en condrictios

6

1.3. Antecedentes generales sobre la especie en estudio

8

1.4. Antecedentes sobre la pesquería de elasmobranquios

10

1.5. Pesquería de *Mustelus mento* en Chile

13

1.6. Parasitología

16

<b>2. Objetivos</b>	<b>17</b>
2.1. Objetivos generales	17
2.2. Objetivos específicos	17
<b>3. Materiales y métodos</b>	<b>18</b>
3.1. Especie en estudio	18
3.2. Procesamiento de las muestras	18
3.2.1. Disección de los ejemplares	18
3.2.2. Estudios con microscopía de luz	23
3.2.2.1. Fijación	23
3.2.2.2. Deshidratación	23
3.2.2.3. Preinclusión	24
3.2.2.4. Inclusión y corte	24
3.2.2.5. Tinción de los cortes	25
3.2.2.5.1. Hematoxilina eosina	25
3.2.2.5.2. Alcian blue	26
3.2.2.5.3. Van Gieson	27
3.2.3. Estudios con microscopía electrónica de barrido	28
3.2.3.1. Fijación	28
3.2.3.2. Deshidratación	29
3.3. Análisis de las muestras	30

<b>4. Resultados</b>	<b>31</b>
4.1. Morfología externa de la especie en estudio	31
4.2. Observaciones macroscópicas del intestino espiral	34
4.3. Observaciones microscópicas	40
4.3.1. Mucosa	42
4.3.2. Submucosa	47
4.3.3. Determinación de parásitos	50
<b>5. Discusión</b>	<b>53</b>
<b>6. Conclusiones</b>	<b>66</b>
<b>7. Literatura citada</b>	<b>69</b>

## I. Resumen

Se caracterizó morfológicamente el intestino espiral de *Mustelus mento* (Carcharhiniformes, Triakidae) a partir de ocho ejemplares extraídos en Valparaíso (Quinta Región) y Corral (Décima Región) entre noviembre de 2002 y julio de 2004. Los objetivos generales de este estudio fueron: 1) Caracterizar morfológicamente el intestino de *Mustelus mento* 2) aportar nuevos antecedentes biológicos y morfológicos a la identificación y clasificación de *Mustelus mento* y 3) aprender como biólogo marino a enfrentar una investigación científica sobre una especie marina.

Los intestinos fueron prefijados en AFA mediante perfusión de la vena dorsal intestinal y postfijados en inmersión con el mismo fijador. Se disecaron las espiras intestinales para su estudio. Para la descripción macroscópica se utilizó una cámara de video, fotografías y lupa estereoscópica. Para el análisis histológico se realizaron inclusiones en parafina y cortes de 7  $\mu\text{m}$  de espesor, teñidos con Hematoxilina-eosina, Van Gieson, Alcian blue y PAS.

El intestino de *Mustelus mento* es de tipo cónico-espiral. Presenta diferencias tanto en el patrón de ordenación de las vellosidades, como en la altura y orientación de los pliegues de la superficie de las espiras. Histológicamente las espiras están compuestas internamente por: 1) la

mucosa 2) la submucosa y 3) la adventicia. La mucosa está dispuesta hacia el lumen intestinal y está formada por un epitelio monoestratificado de células absortivas y caliciformes. Bajo el epitelio se encuentra la lámina basal, que le da soporte a las células epiteliales, luego se observa el corion o lámina propia y la muscular de la mucosa. La submucosa es rica en fibras colágenas dispuestas en gruesos manojos y contiene un gran número de vasos sanguíneos de diversos calibres. La capa adventicia se comunica al exterior del intestino mediante una serosa.

Los céstodos encontrados confirman la especificidad entre los parásitos *Orygmatobothrium musteli* y *Phyllobothrium lactuca* con tiburones del género *Mustelus*, por lo que este sigue siendo un carácter de identificación junto con sus rasgos morfológicos externos e internos.

Es necesario profundizar los estudios con microscopía electrónica y biología molecular. Se señalan líneas de investigación aún no desarrolladas en nuestro país, que podrían ser focos de investigación en favor de la conservación, conocimiento y caracterización de tiburones en Chile.

La información sobre los aspectos biológicos de los tiburones y rayas chilenas es muy escasa, por lo que esta tesis constituye un aporte al entregar caracteres anatómicos internos de *Mustelus mento*, tanto a nivel macroscópico como microscópico.

<b>III. Lista de figuras</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1. 1.</b> Número de especies de peces en Chile, consideradas por diferentes autores. Modificado de Pequeño (2000), con permiso del autor.	<b>2</b>
<b>Figura 1.2.</b> Ejemplar hembra de <i>Mustelus mento</i> , capturada frente a Caleta Higuierillas, Concón, V Región, Chile. Julio de 2003.	<b>3</b>
<b>Figura 1.3.</b> Porción del tubo digestivo de <i>Mustelus mento</i> , que comprende los estómagos cardiaco y pilórico y el intestino.	<b>7</b>
<b>Figura 1.4.</b> Distribución geográfica de <i>Mustelus mento</i> . Se muestra en color rojo las zonas habitadas por la especie en estudio. Modificado de Atlas Mundial Encarta (1988-1996).	<b>9</b>
<b>Figura 1.5.</b> Desembarques totales (toneladas) de <i>Mustelus mento</i> por año según SERNAPesca (2001).	<b>14</b>
<b>Figura 1.6.</b> Desembarques totales (toneladas) de <i>Mustelus mento</i> por Región y por año según SERNAPesca (2001).	<b>15</b>
<b>Figura 3.1.</b> Incisión abdominal del ejemplar para disecar el intestino.	<b>19</b>
<b>Figura 3.2.</b> Extracción del intestino.	<b>20</b>
<b>Figura 3.3.</b> Perfusión del intestino por la vena dorsal intestinal.	<b>20</b>

<b>Figura 3.4.</b> Disección del intestino para extraer muestras de las espiras internas.	<b>21</b>
<b>Figura 3.5.</b> Vista con lupa de un trozo aislado de espira intestinal.	<b>22</b>
<b>Figura 4.1.</b> Vista lateral externa de dos hembras de <i>Mustelus mento</i> .	<b>31</b>
<b>Figura 4.2.</b> Visión ventral de la cabeza de un ejemplar hembra.	<b>32</b>
<b>Figura 4.3.</b> Visión dorsal de la cabeza de <i>Mustelus mento</i> .	<b>33</b>
<b>Figura 4.4.</b> Vista ventral completa de <i>Mustelus mento</i> .	<b>34</b>
<b>Figura 4.5.</b> Vista macroscópica de parte del tubo digestivo.	<b>35</b>
<b>Figura 4.6.</b> Vista macroscópica externa del intestino.	<b>36</b>
<b>Figura 4.7.</b> Vista macroscópica interna del intestino.	<b>38</b>
<b>Figura 4.8.</b> Visión superficial con lupa en primera espira intestinal.	<b>39</b>
<b>Figura 4.9.</b> Visión superficial con lupa en novena espira intestinal.	<b>39</b>
<b>Figura 4.10.</b> Corte histológico de la pared intestinal. Se observan las distintas capas de tejido que la componen.	<b>41</b>
<b>Figura 4.11.</b> Corte histológico en la sexta espira intestinal.	<b>41</b>
<b>Figura 4.12.</b> Corte histológico en la séptima espira intestinal. Se muestra el contacto con la pared externa.	<b>42</b>
<b>Figura 4.13.</b> Corte histológico de pared externa del intestino espiral.	<b>43</b>

<b>Figura 4.14.</b> Corte histológico en tercera espira.	<b>44</b>
<b>Figura 4.15.</b> Corte histológico (50x). Se muestra la submucosa intestinal.	<b>45</b>
<b>Figura 4.16.</b> Corte histológico (100x). Se muestra la submucosa intestinal.	<b>46</b>
<b>Figura 4.17.</b> Corte histológico (400x). Se muestra la submucosa intestinal.	<b>48</b>
<b>Figura 4.18.</b> Corte histológico transversal de una arteria en la tercera espira.	<b>49</b>
<b>Figura 4.19.</b> Microfotografía electrónica de barrido de <i>Orymatobothrium musteli</i>	<b>51</b>
<b>Figura 4.20.</b> Visión con lupa de montaje <i>in toto</i> de <i>Orymatobothrium musteli</i> .	<b>51</b>
<b>Figura 4.21.</b> Visión macroscópica de <i>Calliobothrium verticillatum</i> adherido a la tercera espira.	<b>52</b>
<b>Figura 4.22.</b> Microfotografía electrónica de barrido de <i>Calliobothrium verticillatum</i> .	<b>52</b>

## **Dedicatoria**

Quiero dedicar esta Tesis a toda mi familia...

A mis dos hermanitas, que adoro y especialmente a mis padres, que siempre me han apoyado y han seguido con entusiasmo y alegría la mayoría de mis locuras.

A ustedes les digo que este trabajo va a ser el comienzo de lo que espero sea una larga vida dedicada al estudio de los tiburones.

Los amo y este logro es de ustedes y mío, porque yo solo nunca lo hubiera logrado...

## **Agradecimientos**

A mi profe guía, por ser plenamente lo que su cargo indica, y enseñarme a ser una mejor persona en un medio donde la integridad es difícil de mantener. Le doy las gracias por las lecciones de vida y discusiones, junto con pedirle disculpas por las 118 canas (93 de ellas verdes) que hice surgir de su cuero cabelludo y que probablemente estaban destinadas a sus hijos y nietos... Todo el esfuerzo valió la pena!!!

A los profes Carvajal y Balbontín, por su disposición y buena voluntad cada vez que necesité algo... y cuando no lo necesité también. Gracias!

Mono: Siempre dispuesto a ayudar en lo que sea y cuando yo lo necesite... Gracias por el ánimo y la alegría que siempre contagias!!!

Enano: La crítica ácida que todos necesitamos de un amigo... Gracias por las observaciones, largas conversaciones y por la ayuda!!!

A mi gran amiga, compañera, confidente y apoyo en todos los aspectos imaginables... Carolinita: Le das la dulzura, belleza y motivación a todo lo que hago o dejo de hacer... Gracias por estar conmigo y soportarme siempre... Te amo!!!

Finalmente al Cristian, mi primo, que desde el cielo siempre me ha cuidado y que siempre pone en mi camino todo lo que necesito para ser feliz...

Te hecho mucho de menos!!!

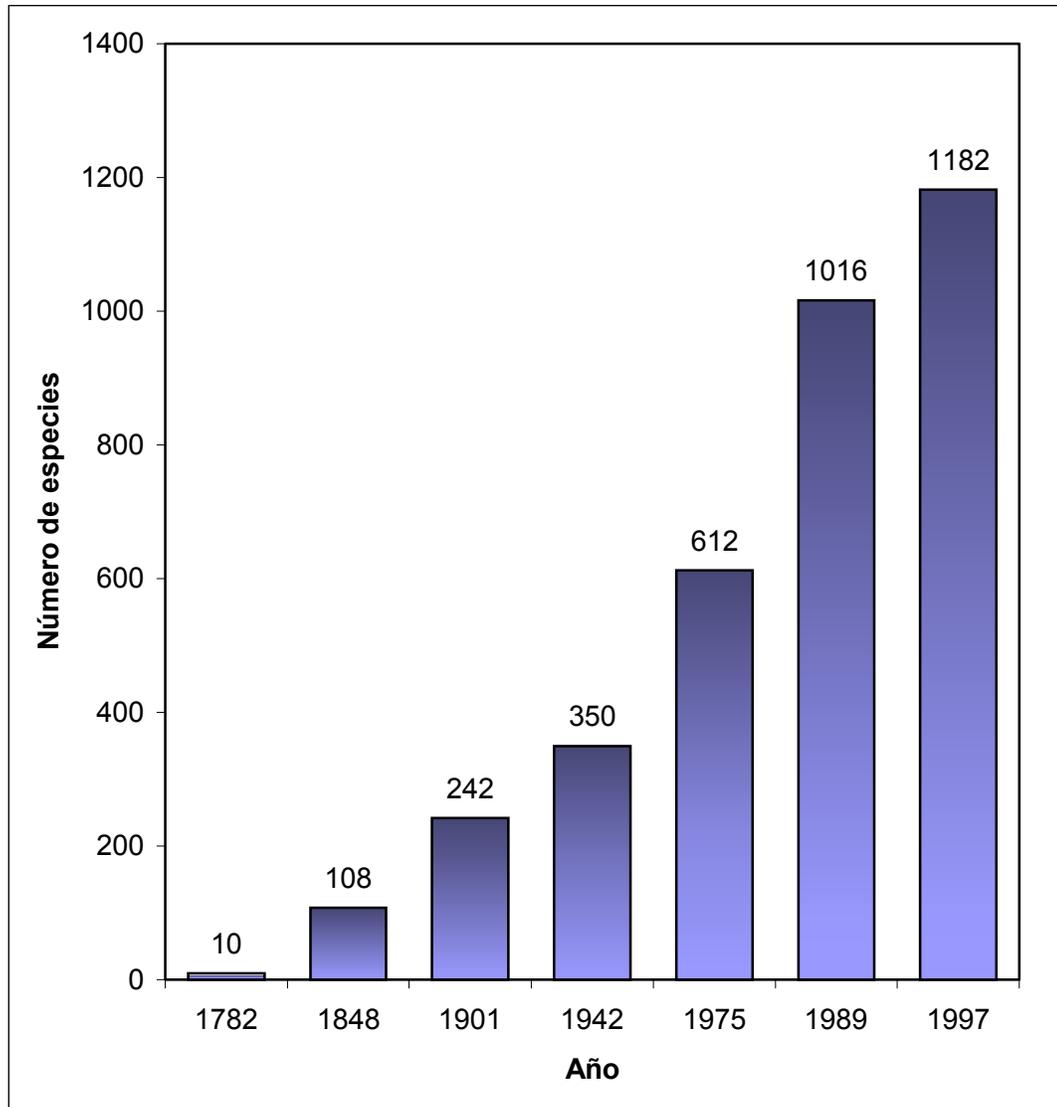
## **1. Introducción**

### **1.1. Aspectos generales de clasificación**

Los conceptos generales de clasificación y filogenia, así como el conocimiento de la composición ictiofaunística de Chile, han experimentado fuertes cambios desde fines del siglo XVIII, cuando la exploración del Pacífico sudoriental aportó nuevos resultados que llevaron a un aumento explosivo en las cifras de taxa conocidos. Trabajos entre los cuales se destacan los de Molina (1782); Gay (1848); Delfín (1901); Fowler (1941; 1942-1943); Bahamonde & Pequeño (1975) y Pequeño (1989; 1997; 2000) así lo indican (Figura 1.1).

Pequeño *et al.* (1990), refiriéndose a los peces chilenos, dejaron en evidencia la falta de información sobre sus aspectos biológicos y distribución geográfica, relacionados con aspectos ecológicos, genéticos y conductuales. De este modo, han surgido nuevas fuentes de incertidumbre con respecto al estudio de este diverso grupo de peces. El desconocimiento de la distribución geográfica, así como el de los orígenes y relaciones biogeográficas de la ictiofauna chilena son atribuibles, en parte, a la escasez de estudios de taxonomía y sistemática, disciplinas que

son requisitos ineludibles para el estudio de cualquier aspecto sobre la biología de estos organismos (Pequeño 2000).



**Figura 1. 1.** Número de especies de peces en Chile, consideradas por diferentes autores. Modificado de Pequeño (2000), con permiso del autor.

La especie en estudio, *Mustelus mento* (Figura 1.2), pertenece a la Clase Chondrichthyes, categoría taxonómica que presenta diversas características y estructuras anatómicas consideradas como caracteres plesiomórficos para los gnatostomados, tales como un endoesqueleto formado completamente por cartílago calcificado, carecer de vejiga natatoria y presentar dientes no fusionados a la mandíbula (Rasmussen & Arnason 1999a). Además, de la base de las aletas pélvicas de los machos, surgen unas estructuras intromitentes denominadas mixopterigios u órganos copuladores por Lagler *et al.* (1984) o bien *claspers* (Rasmussen & Arnason 1999a), que ayudan al macho en el momento del apareamiento (Romer 1966).



**Figura 1.2.** Ejemplar hembra de *Mustelus mento*, capturada frente a Caleta Higuierillas, Concón, V Región, Chile. Julio de 2003.

Siguiendo la clasificación taxonómica propuesta por Nelson (1994), la Clase Chondrichthyes se divide en las Subclases Elasmobranchii y Holocephali. La primera consta de 763 especies (Nelson 1984) y presentan entre cinco y siete pares de aberturas branquiales de inserción lateral o ventral, su piel está cubierta por dentículos dérmicos y el cartílago palatoc cuadrado no está fusionado al cráneo (Compagno 1984a).

La Subclase Holocephali, integrada por 30 especies (Nelson 1994), corresponde al grupo de las quimeras, las que se diferencian de los elasmobranquios por presentar aberturas branquiales cubiertas por un opérculo, no presentar ningún tipo de escamas sobre la piel y porque el cartílago palatoc cuadrado está fusionado al cráneo (Romer 1966; Lagler *et al.* 1984; Grogan *et al.* 1999). El estudio de la anatomía de los peces de este taxón, especialmente de su mandíbula, ha ayudado a comprender la diversificación de los condriictios con respecto a otros peces (Grogan *et al.* 1999).

En las últimas décadas, gracias a los grandes avances logrados en el campo de la biología molecular, se han podido estudiar diversos caracteres genéticos, proporcionando abundantes datos para examinar el flujo y la variación de los genes en poblaciones naturales (Heist 1999) así como también, según lo señalado por Smith & Benson (2001), para la

correcta identificación de especies. Se ha intensificado la discusión sobre el origen filogenético de los tiburones y la relación que éstos podrían tener con respecto a otros grupos de peces o incluso a los vertebrados terrestres (Cao *et al.* 1998; Rasmussen & Arnason 1999b), tema que según Rasmussen & Arnason (1999a) no se ha profundizado adecuadamente en gnatostomados.

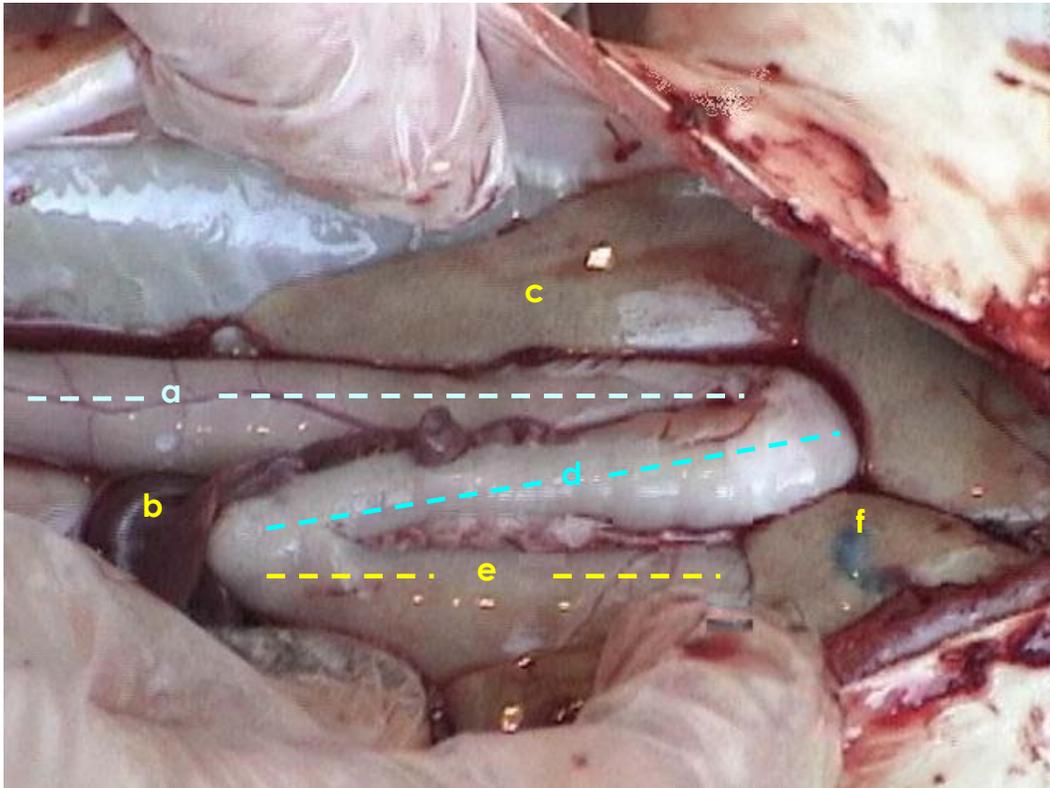
Algunos rasgos en la anatomía de los condriictios, tales como el endoesqueleto cartilaginoso o la carencia de opérculo eran considerados, en un principio, como características anatómicas primitivas. Posteriormente, con ayuda de la filogenética molecular, se llega a una conclusión opuesta, ya que los rasgos mencionados anteriormente corresponderían a variantes modernas, propias de un largo y complejo proceso evolutivo, que se expresaría como la mantención de una típica condición embrionaria en el tiempo (Arnason *et al.* 2001).

A pesar de que la filogenética molecular se ha transformado en una herramienta poderosa para dilucidar la historia evolutiva de distintos grupos de animales marinos y terrestres, aun se presentan bastantes dificultades para confeccionar un árbol filogenético definitivo (Cao *et al.* 1998). Con respecto a este campo de la investigación, es importante resaltar lo señalado por Cancino & Meléndez (2000) en cuanto a que el

desarrollo de la sistemática filogenética, cuyas bases se encontrarían en Darwin (1872), sirven de enlace conceptual y metodológico entre la evolución, ecología y biogeografía; emergiendo como disciplina integracionista y con el potencial para obtener evidencia de la ancestría a partir de todos los campos de la biología básica y aplicada.

## **1.2. Antecedentes generales sobre el sistema digestivo en condriictios**

El aparato de alimentación de los vertebrados es un complejo sistema mecánico, que en peces adquiere variados niveles de complejidad (Lagler *et al.* 1984; Motta *et al.* 2002). El intestino espiral (Figura 1.3), aparte de estar presente en todos los condriictios, se puede encontrar en varios grupos de peces óseos e incluso en ciclóstomos (Romer 1966). Su gran utilidad radica en que proporciona una vasta superficie de contacto con el alimento en un tubo relativamente corto y compacto, lo que a la vez permite a estos peces tener más espacio para el estómago, hígado, útero y otros órganos internos (Crow *et al.* 1990).



**Figura 1.3.** Parte del tubo digestivo de *Mustelus mento*. (a) Intestino, (b) bazo, (c) hígado, (d) estómago pilórico, (e) estómago cardíaco, (f) páncreas.

Según lo señalado por Compagno (1988), este tipo de intestino presentaría tres variantes morfológicas de acuerdo a la forma o disposición de las espiras internas y el número y posición de los puntos de fijación con la pared intestinal. La primera es la del tipo conicoespiral, consistente en series de conos y que es característica de la especie *Mustelus laevis* (Carcharhiniformes: Triakidae); la segunda es la del tipo anular, formada por una serie de anillos paralelos aplanados y que está presente en la especie *Ginglymostoma cirratum* (Orectolobiformes,

Ginglymostomatidae) y la tercera es la tipo pergamino, correspondiente a un rollo que gira en torno al eje longitudinal del intestino, característico de *Galeocerdo cuvier* (Carcharhiniformes: Carcharhinidae) (Jollie 1962 *vide* Crow *et al.* 1990).

### **1.3. Antecedentes generales sobre la especie en estudio**

*Mustelus mento* (Carcharhiniformes: Triakidae) (Figura 1.2) es una especie que habita las costas del Pacífico sudoriental, desde las islas Galápagos hasta el extremo sur de Chile, incluyendo el archipiélago de Juan Fernández. Por otra parte, existen registros de esta especie en el Atlántico sudoccidental (Compagno 1984b; Pequeño 1989; Pequeño *et al.* 1990) (Figura 1.4) que, según lo señalado por Compagno (1984b), podrían corresponder a otras especies del mismo género similares externamente, como *Mustelus schmitti* o *M. fasciatus*.

Vive preferentemente cerca de la costa, entre los 16 y 50 m de profundidad (Compagno 1984b). La especie es conocida comúnmente como “musola fina” (Compagno 1984b), “tollo blanco” (Sielfeld & Vargas 1992) o “tollo” (SERNAPesca 2001; pescadores artesanales, com. pers.).



**Figura 1.4.** Distribución de *Mustelus mento*. Se muestra en color rojo las zonas habitadas por la especie en estudio. Modificado de Atlas Mundial Microsoft Encarta.

Según Sielfeld & Vargas (1992) existirían más de diez especies de "tollo" en nuestro país, las que corresponden a *Galeorhinus galeus* (tollo cazón), *Triakis maculata* (tollo manchado), *Mustelus mento* (tollo blanco),

*M. whitneyi* (tollo), *Aculeola nigra* (tollo negro de cachos), *Centroscyllium granulatum* (tollo negro raspa), *C. nigrum* (tollo negro peine), *Squalus acanthias* (tollo de cachos), *S. mitsukurii* (tollo de cachos), *Deania calcea* (tollo pajarito), *Etmopterus villosus* (tollo lucero de Hawaii), *E. granulosus* (tollo negro narigón) y *E. pusillus* (tollo lucero liso), y que pertenecen a distintos grupos taxonómicos dentro de la Clase Chondrichthyes. Lo anterior, junto a la carencia de especialistas que cuenten con los medios necesarios para llevar un adecuado control de las capturas, hace difícil que se logre conocer en forma más precisa el real efecto de la presión de pesca sobre la especie en estudio.

#### **1.4. Antecedentes sobre la pesquería de elasmobranquios**

En la actualidad el estado en que se encuentran muchas de las poblaciones de tiburones en el mundo es escasamente conocido, lo que dificulta el desarrollo e implementación de medidas de conservación apropiadas tendientes a mantener sus poblaciones en el largo plazo. Esta falta de conocimiento se basa en varios factores, tanto político-culturales como biológicos, y queda de manifiesto en el bajo interés que tradicionalmente se ha demostrado por el manejo e investigación de los elasmobranquios. El mal concepto público que se ha tenido durante largo

tiempo con respecto a estos peces, junto a las dificultades logísticas asociadas al estudio de ellos, han sido determinantes en el bajo interés histórico por su investigación (Shivji *et al.* 2002).

Dada la marcada disminución en la cantidad y calidad de las capturas de peces óseos, es importante incrementar en forma significativa el número de estudios biológicos en elasmobranquios antes de que sean sobreexplotados, más aun si se considera el creciente interés mundial por el consumo de estos peces (Frisk *et al.* 2001; Smith & Benson 2001).

Los elasmobranquios, a diferencia de muchas especies de peces óseos, son animales particularmente longevos y de crecimiento lento, con altas edades de primera madurez sexual, bajas fecundidades y a menudo largos períodos de gestación, el efecto de la pesca sobre ellos se manifiesta de forma más notoria (Musick *et al.* 2000; Frisk *et al.* 2001).

Son muy poco conocidos los distintos efectos que provocan algunas condiciones ambientales sobre parámetros biológicos tales como la edad y talla, tanto de primera madurez sexual como la fecundidad y mortalidad. Se han utilizado modelos predictivos empíricos para estimar parámetros vitales en algunas especies, sin contar con suficientes datos de historia de vida o demográficos, a pesar de lo difícil que resulta aplicar estos modelos pesqueros tradicionales, basados generalmente en la

determinación de edad de los ejemplares, lo cual en elasmobranquios es un área difícil de abordar (Frisk *et al.* 2001).

Más antecedentes sobre manejo y regulación pesqueros son entregados por Musick *et al.* (2000), que hace referencia a la American Fisheries Society (AFS) y a algunas sugerencias y medidas tomadas para proteger a los elasmobranquios. La AFS exige la liberación de tiburones y rayas correspondientes a fauna acompañante que estén en condiciones de sobrevivir y sugiere que las agencias reguladoras deben velar por la utilización completa de los ejemplares capturados, prohibiendo el desperdicio y el *finning*. Además, dada la condición migratoria de casi todos los tiburones, sobre todo los de mayor tamaño, se manifiesta la necesidad de crear planes que integren varias áreas geográficas y políticas.

El mayor entendimiento y la elaboración de nuevos y mejores métodos para determinar parámetros biológicos en elasmobranquios, especialmente los que tienen relación con su reproducción y ontogenia, son cruciales para el desarrollo de regímenes de manejo más eficientes en favor de estos peces (Leonard *et al.* 1999; Frisk *et al.* 2001). Varios antecedentes biológicos en diversos grupos de elasmobranquios son entregados por Benson *et al.* (2001), lo que en conjunto con el estudio de

algunas correlaciones morfofuncionales (Evans & Piermarini 2001), morfológicas (Motta et al. 1997) e histológicas (Leake 1975), constituyen un valioso aporte al conocimiento de varios aspectos biológicos de los elasmobranquios, que van a permitir comprender de mejor forma el comportamiento de sus parámetros vitales.

### **1.5. Pesquería de *Mustelus mento* en Chile**

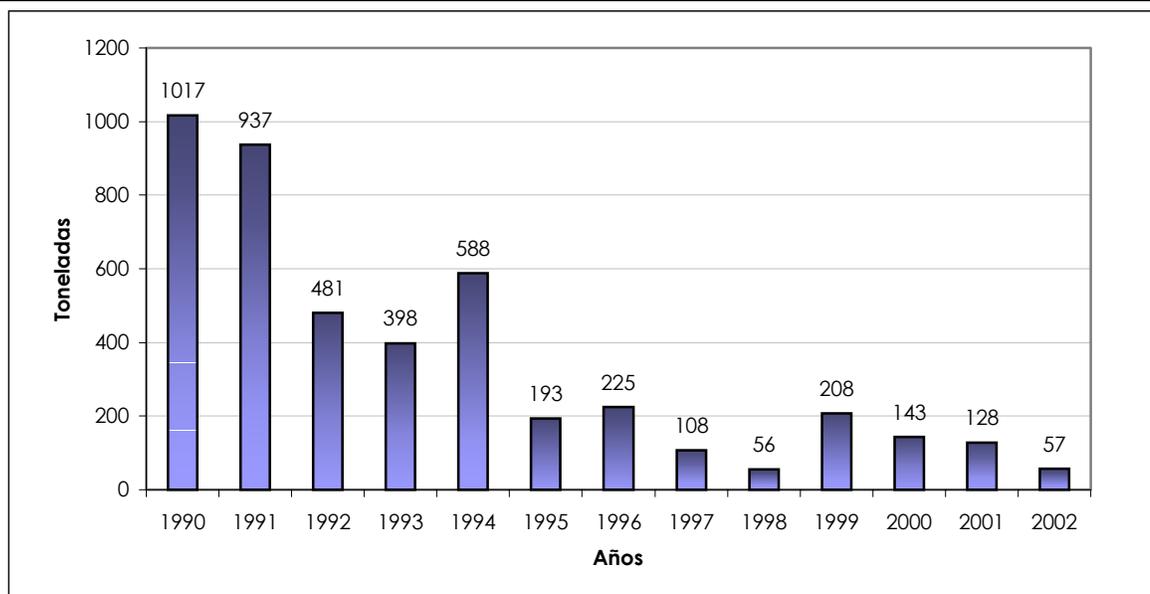
A partir de 1990 SERNAPesca comienza a registrar las capturas de *Mustelus mento* bajo el nombre de “tollo” en la categoría de peces. Sin embargo, esta información dista bastante de la real cantidad de ejemplares de esta especie que son capturados anualmente, siendo los problemas de identificación la principal causa de estas imprecisiones en los datos históricos.

Según SERNAPesca (2001), las capturas de tollo han disminuido considerablemente durante la década en que estas capturas han sido registradas (Tabla 1.1; Figuras 1.5 y 1.6). La disminución sostenida en los desembarques pueden ser motivos de discusión y de creación de nuevos proyectos de investigación. Por ahora se debe hacer énfasis en

proporcionar datos biológicos básicos y de ecología poblacional si se quiere llegar a regular la pesca de esta especie.

**Tabla 1.1.** Desembarque de *Mustelus mento*, en toneladas por Región a partir de 1990. Datos obtenidos de SERNAPesca (2001).

Año	Regiones												Total
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	
1990	13	7	150	1	45	0	190	1	37	260	313	0	1017
1991	10	0	51	0	59	3	199	5	243	251	77	10	908
1992	2	2	8	0	51	4	158	3	27	140	63	0	458
1993	20	10	8	0	91	7	117	0	49	56	17	0	375
1994	21	33	3	5	56	6	100	13	27	26	1	0	291
1995	22	8	2	7	31	1	14	32	3	73	0	0	193
1996	13	23	1	0	46	4	73	21	2	23	0	0	206
1997	19	4	0	3	9	15	29	11	0	18	0	0	108
1998	5	0	5	1	7	4	13	16	1	3	1	0	56
1999	15	42	81	11	86	0	0	1	0	0	0	1	237
2000	4	0	0	0	16	11	8	49	0	38	14	3	143
2001	5	0	1	0	12	3	3	0	1	91	9	2	127
2002	0	1	0	2	10	10	6	1	2	17	1	7	57
<b>Total Región</b>	<b>149</b>	<b>129</b>	<b>310</b>	<b>28</b>	<b>509</b>	<b>58</b>	<b>904</b>	<b>152</b>	<b>390</b>	<b>979</b>	<b>495</b>	<b>16</b>	<b>4119</b>



**Figura 1.5.** Desembarques totales (toneladas) de *Mustelus mento* por año según SERNAPesca (2001).

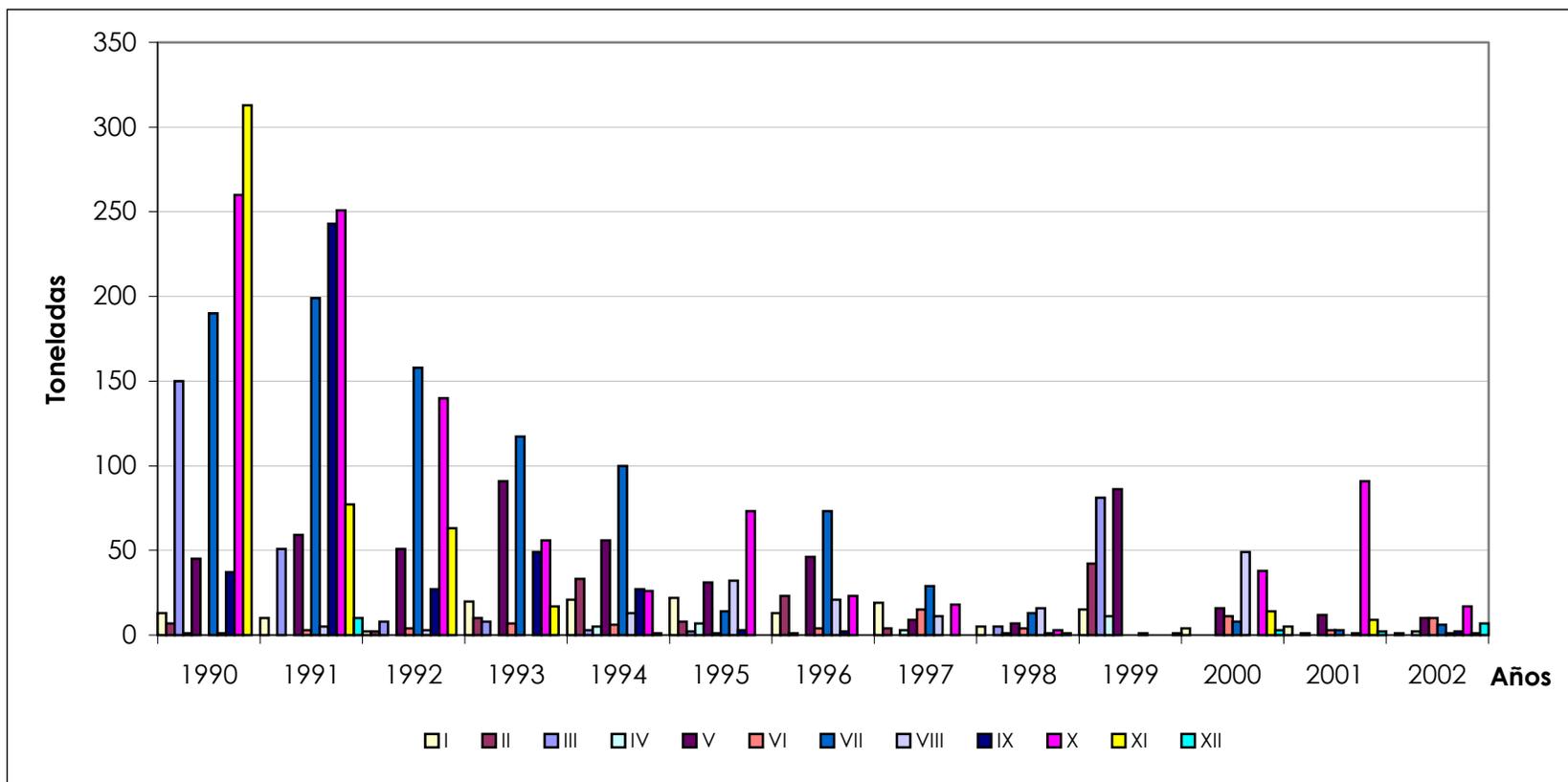


Figura 1.6. Desembarques totales (toneladas) de *Mustelus mento* por Región y por año según SERNAPesca (2001).

## 1.6. Parasitología

Un buen aporte al conocimiento de los hábitos alimentarios y distribución de los tiburones es el de los estudios parasitológicos. Los parásitos han sido utilizados como indicadores biológicos o marcadores para proporcionar información sobre varios aspectos de la biología del hospedador (Williams *et al.* 1992). Los aportes realizados por distintos autores, tales como Carvajal (1974), Carvajal & Ruiz (1987) Escalante & Carvajal (1981), Caira (1990), Olson *et al.* (1999), Knoff *et al.* (2001), Suriano & Labriola (2001), Ruhnke (1996) y Ruhnke *et al.* (2000), entre otros, se han utilizado para contribuir al esclarecimiento de distintas dudas sobre filogenia y taxonomía, tanto de los parásitos como de los elasmobranquios que los contienen. Las bondades del marcaje con parásitos en comparación a elementos artificiales, que pudieran alterar el normal comportamiento del hospedador, son destacadas por Williams *et al.* (1992) en estudios pesqueros tendientes a definir distintas poblaciones de peces.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivos generales**

- 2.1.1.** Caracterizar morfológicamente el tubo digestivo de *M. mento*.
- 2.1.2.** Aportar nuevos antecedentes biológicos y morfológicos a la identificación y clasificación de *Mustelus mento*.
- 2.1.3.** Aprender, como biólogo marino, a enfrentar una investigación científica.

### **2.2. Objetivos específicos**

- 2.2.1.** Describir características macroscópicas generales del tubo digestivo de *Mustelus mento* y las relaciones anatómicas del intestino espiral.
- 2.2.2.** Describir los tipos de tejidos que constituyen el intestino espiral en *M. mento*.
- 2.2.3.** Describir la histología de la pared del intestino espiral y las principales diferencias entre espiras.
- 2.2.4.** Discutir la importancia de las estructuras histológicas del intestino y su posible relación con la especificidad parasitaria de los céstodos que habitan en ella.

### **3. Materiales y métodos**

#### **3.1. Especie en estudio**

Se trabajó con ocho ejemplares de la especie *Mustelus mento* (Figura 1.2), identificados según clave de Compagno (1984b).

Los individuos fueron capturados por pescadores artesanales en la bahía de Valparaíso y en la Décima Región, frente a Valdivia, entre los meses de noviembre de 2002 y julio de 2004 mediante redes. Se llevó material de fijación a terreno, aunque se intentó mantener vivos a los ejemplares hasta su procesamiento en laboratorio.

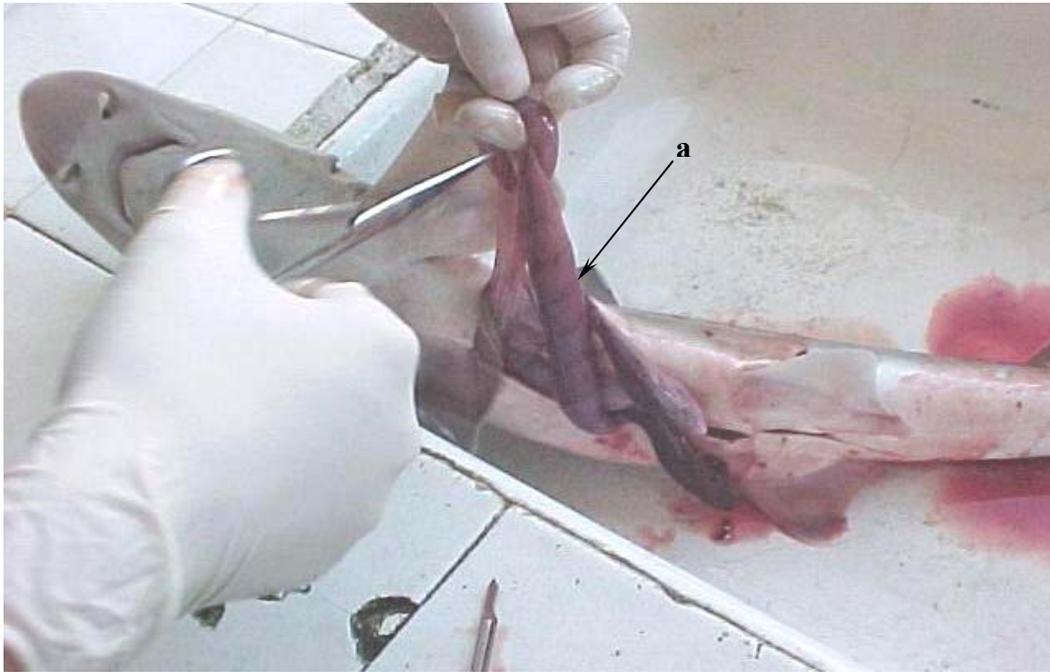
#### **3.2. Procesamiento de las muestras**

##### **3.2.1. Disección de los ejemplares**

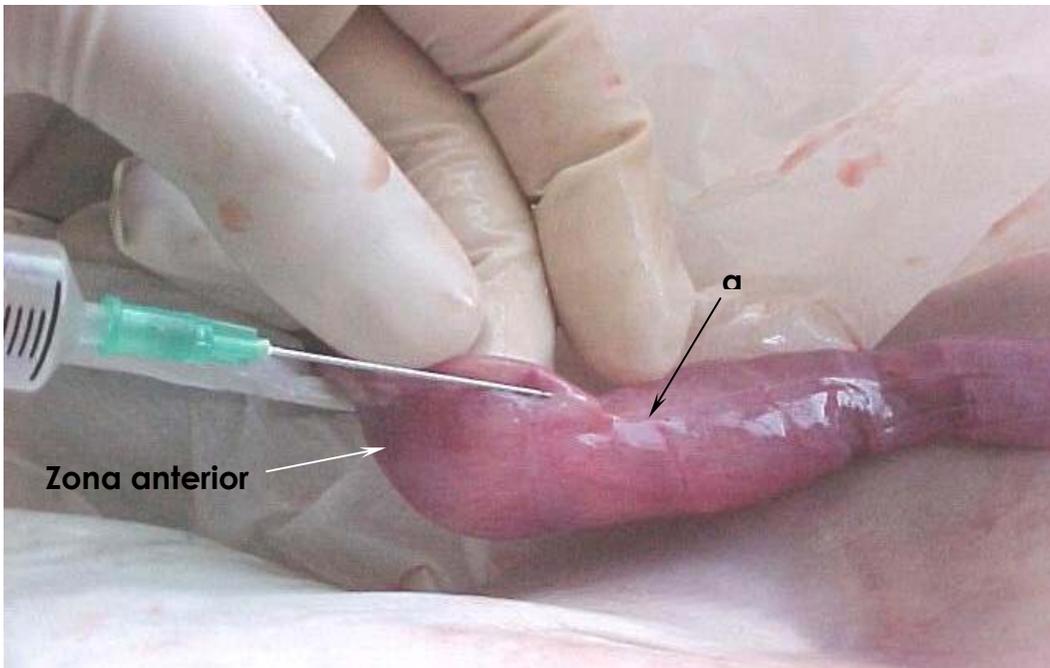
Se realizó una incisión desde la cintura pectoral hasta la cintura pélvica, se disecó y perfundió el intestino espiral con 400 ml de fijador a través de las venas ventral y dorsal intestinal (Figuras 3.1; 3.2 y 3.3).



**Figura 3.1.** Vista ventral de una hembra de *Mustelus mento*. Se realiza una incisión en el abdomen, desde la cintura pectoral hasta la cintura pélvica del ejemplar, para diseccionar el intestino.

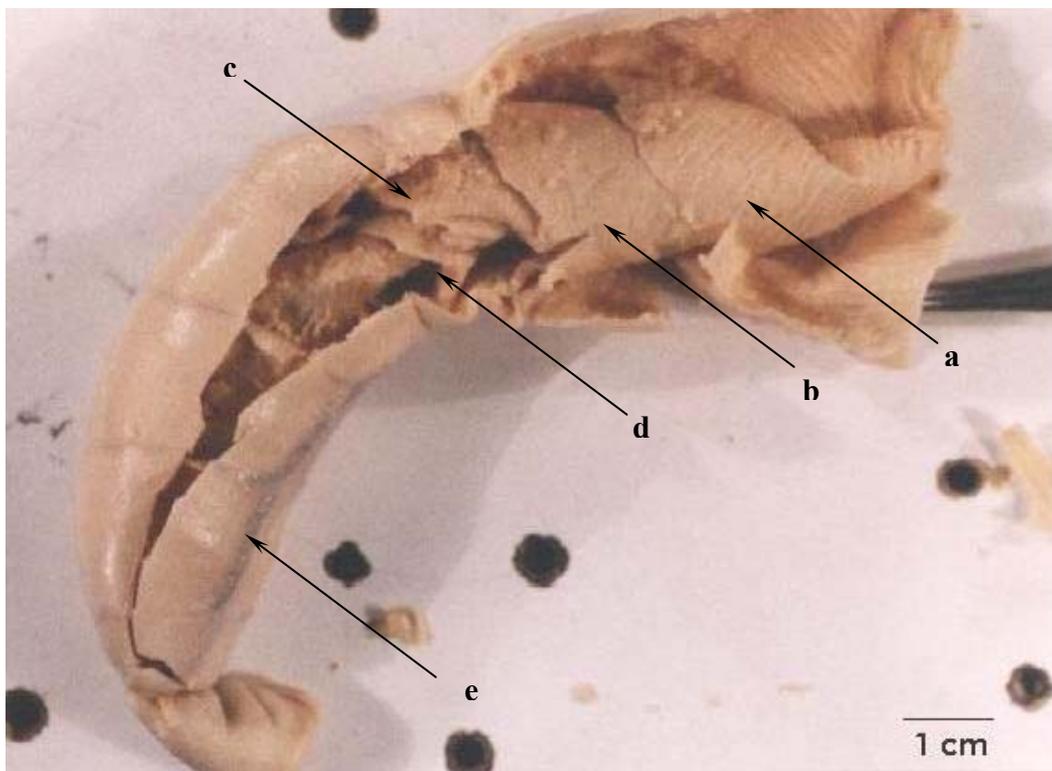


**Figura 3.2.** Se disecciona el intestino de *M. mento* (a) del resto del tubo digestivo cortando en la zona anterior. Luego se cierra un extremo para realizar la fijación por perfusión.



**Figura 3.3.** Se muestra el momento de la perfusión del intestino espiral de *M. mento*. Se inyecta fijador en la vena anterior intestinal (a). Posteriormente se repite la acción a través de la vena dorsal intestinal.

Posteriormente la muestra es dejada en un recipiente con abundante fijador, en una relación 10:1 de volumen de fijador con respecto al volumen de la muestra. Ésta se mantiene inmersa en el fijador a 4°C entre 14 y 18 horas. Posteriormente se abre el intestino y se separa una muestra de 1 cm<sup>2</sup> de cada espira para luego realizar los procedimientos histológicos necesarios (Figuras 3.4 y 3.5).



**Figura 3.4.** Disección del intestino para extraer muestras de las espiras internas. Se realiza un corte longitudinal. (a) Espira 1; (b) espira 2; (c) espira 3; (d) espira 4; (e) vena dorsal intestinal.



**Figura 3.5.** Se separa una muestra de cada espira intestinal interna para analizar bajo la lupa. Posteriormente se aplica el tratamiento para microscopía según sea necesario.

### **3.2.2. Estudios con microscopía de luz**

#### **3.2.2.1. Fijación**

Las muestras fueron fijadas con AFA, consistente en 90 partes de alcohol de 70°, 5 partes de formalina al 4% y 5 partes de ácido acético 1M.

#### **3.2.2.2. Deshidratación.**

Se deshidrató en alcoholes de concentración creciente.

- i. Alcohol 50° 10 minutos.
- ii. Alcohol 50° 10 minutos.
- iii. Alcohol 70° 10 minutos.
- iv. Alcohol 80° 10 minutos.
- v. Alcohol 90° 10 minutos.
- vi. Alcohol 90° 10 minutos.
- vii. Alcohol absoluto 10 minutos.
- viii. Alcohol absoluto 10 minutos.
- ix. Alcohol absoluto + Butanol 10 minutos.
- x. Butanol 10 minutos.
- xi. Butanol 5 minutos.

### **3.2.2.3. Preinclusión**

- i. Butanol y Paraplast 10 minutos.

### **3.5.2.4. Inclusión y corte**

Se incluyó en Paraplast, formando bloques pequeños con la muestra puesta en la orientación deseada según el tipo de corte a realizar. Los cortes histológicos serán realizados con un micrótopo rotatorio y tendrán 7 a 8  $\mu\text{m}$  de grosor.

### **Procedimiento**

- i. Paraplast 1 por 10 minutos a 56-57° C.
- ii. Paraplast 2 por 10 minutos a 56-57° C.
- iii. Paraplast 3 por 5 minutos a 56-57° C.

### **3.2.2.5. Tinción de los cortes**

#### **3.2.2.5.1. Hematoxilina – eosina (Culling. 1974)**

##### **Componentes**

- i. 6 g de hematoxilina.
- ii. 300 ml de alcohol absoluto.
- iii. 300 ml de agua destilada.
- iv. 300 ml de glicerol.
- v. 30 ml de ácido acético glacial.
- vi. Alumbre de potasio en exceso.

##### **Resultados**

- i. El núcleo se ve de color azul intenso, mientras que el tejido conectivo y el citoplasma se ven de color rosado.

### **3.2.2.5.2. Alcian Blue (Culling 1974)**

#### **Método standard para grupos ácidos (COOH y OSO<sub>3</sub>H) (Pears 1960)**

- i. Hidratar los cortes hasta el agua.
- ii. Teñir con Alcian blue 8 GX (1%) en ácido acético (3%); pH 2.5) por 30 minutos.
- iii. Lavar con agua.
- iv. Deshidratar, limpiar y montar en resina.

#### **Resultados**

- i. Mucopolisacáridos ácidos de color azul oscuro.
- ii. Núcleos azul más claro.

#### **Alcian blue (pH 1.0) para grupos sulfato (Pears 1960)**

Técnica histoquímica que permite revelar la presencia de grupos sulfato asociados a mucoproteínas.

## **Procedimiento**

- i. Poner los cortes en agua.
- ii. Teñir con Alcian blue 8 GX (1%) en ácido clorhídrico (0.1N) por 30 minutos. Enjuagar rápidamente con HCl (0.1N).
- v. Secar con papel filtro fino.
- vi. Deshidratar con alcohol, limpiar con xilol y montar en resina.

## **Resultados**

- i. Mucosustancias sulfatadas se tiñen de color azul oscuro.

### **3.2.2.5.3. Van Gieson (M<sup>c</sup> Manus & Mowry 1960)**

#### **Componentes (solución 1)**

- i. 5 ml Fucsina acuosa ácida (1%).
- ii. 100 ml Ácido pícrico acuoso saturado.

### **Componentes (solución 2)**

- i. 15 ml Fucsina acuosa ácida (1%).
- ii. 50 ml Ácido pícrico acuoso saturado.
- iii. 50 ml agua destilada.

### **Resultados**

- i. Colágeno de color rosado a rojo.
- ii. Núcleos azul oscuro a negro.
- iii. Musculatura amarilla.

### **3.2.3. Estudios con microscopía electrónica de barrido**

#### **3.2.3.1. Fijación**

Se fijan los parásitos en glutaraldehído 1M al 4% en buffer fosfato a pH 7,2. La fijación se realiza por inmersión a 4°C durante 24 horas.

### 3.2.3.2. Deshidratación

Se deshidrató en alcoholes de concentración creciente.

- i. Etanol 70° 10 minutos
- ii. Etanol 80° 10 minutos
- iii. Etanol 90° 10 minutos
- iv. Etanol 95° 10 minutos
- v. Etanol 98° 10 minutos
- vi. Etanol 100° 15 minutos
- vii. Etanol 100° y Acetona 100% (1:1) 15 minutos
- viii. Acetona 100% 15 minutos

Posteriormente se realiza el secado a punto crítico. Las muestras completamente deshidratadas son montadas en un soporte de aluminio para realizar el sombreado en oro para la observación al microscopio.

### **3.3. Análisis de las muestras**

Se realizaron observaciones a nivel macroscópico y microscópico del intestino de *Mustelus mento*. Las fotografías de los caracteres morfológicos macroscópicos del intestino y del procedimiento de disección de los ejemplares fueron tomadas con una cámara digital Sony TRV-530.

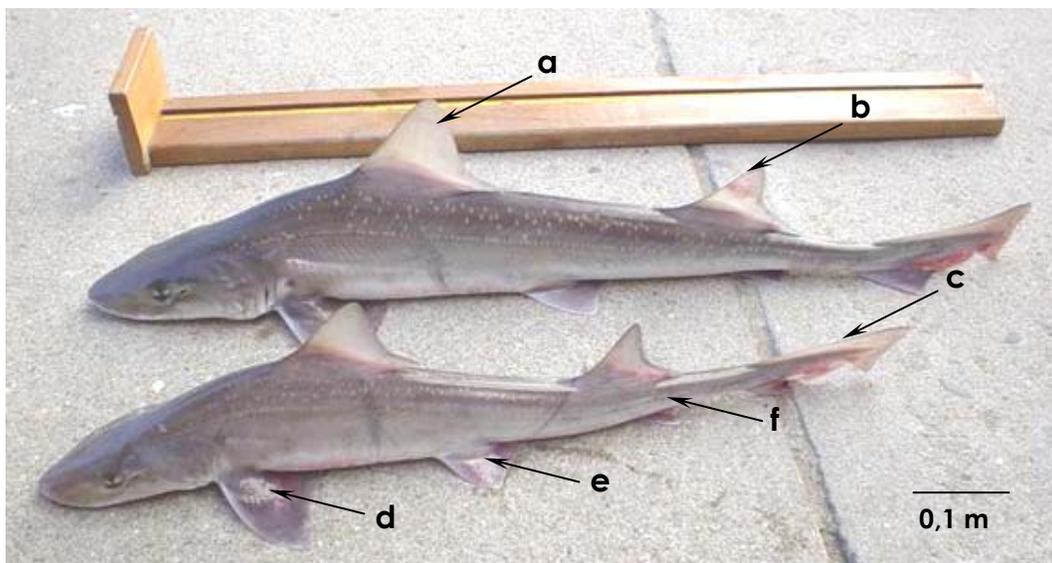
Las microfotografías de cortes histológicos de las espiras intestinales fueron tomadas con una cámara fotográfica mecánica conectada a un microscopio de luz. Posteriormente se digitalizaron las imágenes con un scanner Genius ColorPage-Vivid3X Series v1.1.

Se recolectaron todos los parásitos céstodos de los intestinos analizados para su identificación. Las muestras fueron fijadas en alcohol 96°, AFA o formaldehído y conservadas hasta ser identificadas.

## 4. Resultados

### 4.1. Morfología externa de la especie en estudio

La especie *Mustelus mento* (Figura 4.1) se caracteriza por ser de cabeza aplastada dorsoventralmente y nariz de longitud moderada. Las narinas se ubican ventralmente, por delante de los ojos y el hocico, careciendo de barbillas en sus extremos. Los *flaps* nasales que cubren las narinas son cortos y relativamente triangulares (Figura 4.2). El hocico de los ejemplares de esta especie es relativamente pequeño y redondeado, mientras que sus pliegues labiales externos son cortos, aunque mayores que los internos (Figura 4.2). Sus ojos son ovalados, de disposición lateral y poseen membrana nictitante (Figura 4.3).

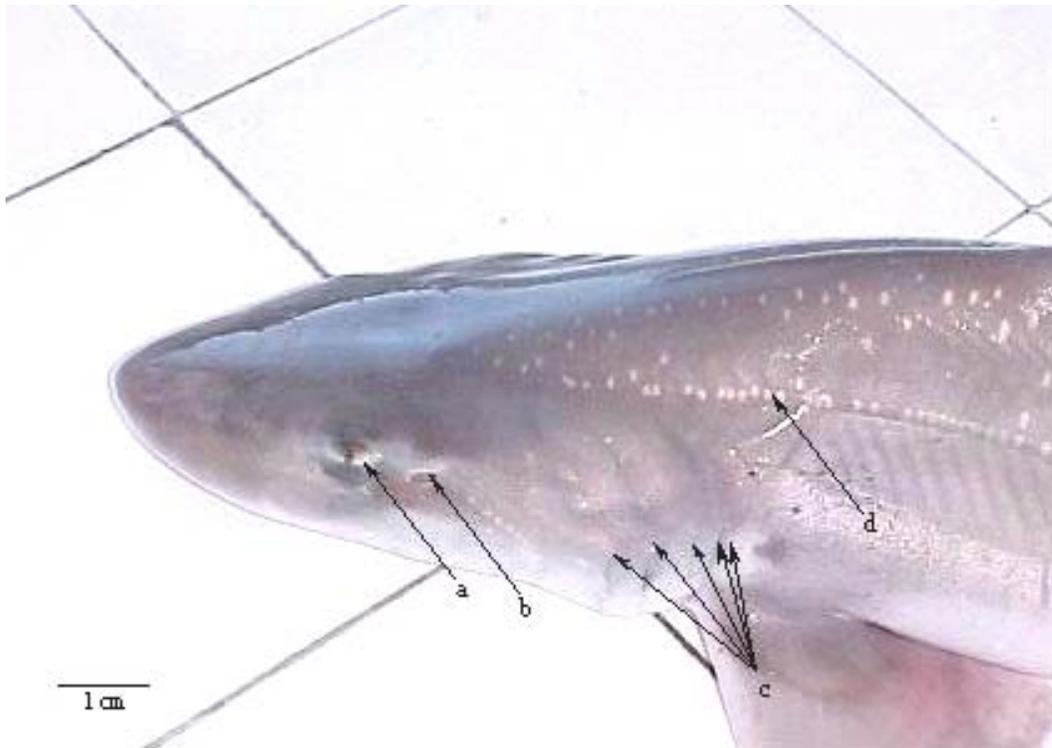


**Figura 4.1.** Vista lateral externa de dos hembras de *Mustelus mento*. (a) Primera aleta dorsal, (b) segunda aleta dorsal, (c) aleta caudal, (d) aleta pectoral izquierda, (e) aleta pélvica izquierda, (f) aleta anal.



**Figura 4.2.** Vista ventral de la cabeza de una hembra de *M. mento*. (a) Flap nasal y (b) Pliegue labial superior.

El rostro del cráneo es de tipo trípode y las paredes preorbitales del condrocáneo están incompletas. Presenta cinco pares de aberturas branquiales de disposición lateral (Figura 4.3). El dorso es de color gris y presenta puntos blancos a lo largo de la línea lateral, desde la cabeza hasta la aleta caudal (Figuras 4.1 y 4.3). La región ventral es de color blanco (Figura 4.4).



**Figura 4.3.** Vista dorsal de la cabeza de *M. mento*. (a) Membrana nictitante, (b) espiráculo, (c) aberturas branquiales, (d) línea lateral.

El tronco es cilíndrico, posee dos aletas dorsales carentes de agujones bastante similares en cuanto a forma y tamaño (Figura 4.1). En la región ventral hay dos aletas pélvicas y una aleta anal (Figura 4.4). La aleta caudal es claramente heterocerca, con mayor desarrollo de su lóbulo superior; sin quillas laterales en el pedúnculo caudal (Figura 4.5).



**Figura 4.4.** Vista ventral de una hembra de *M. mento*. (a) Aleta pectoral, (b) aleta pélvica, (c) aleta anal, (d) aleta caudal.

#### **4.2. Observaciones macroscópicas del intestino espiral**

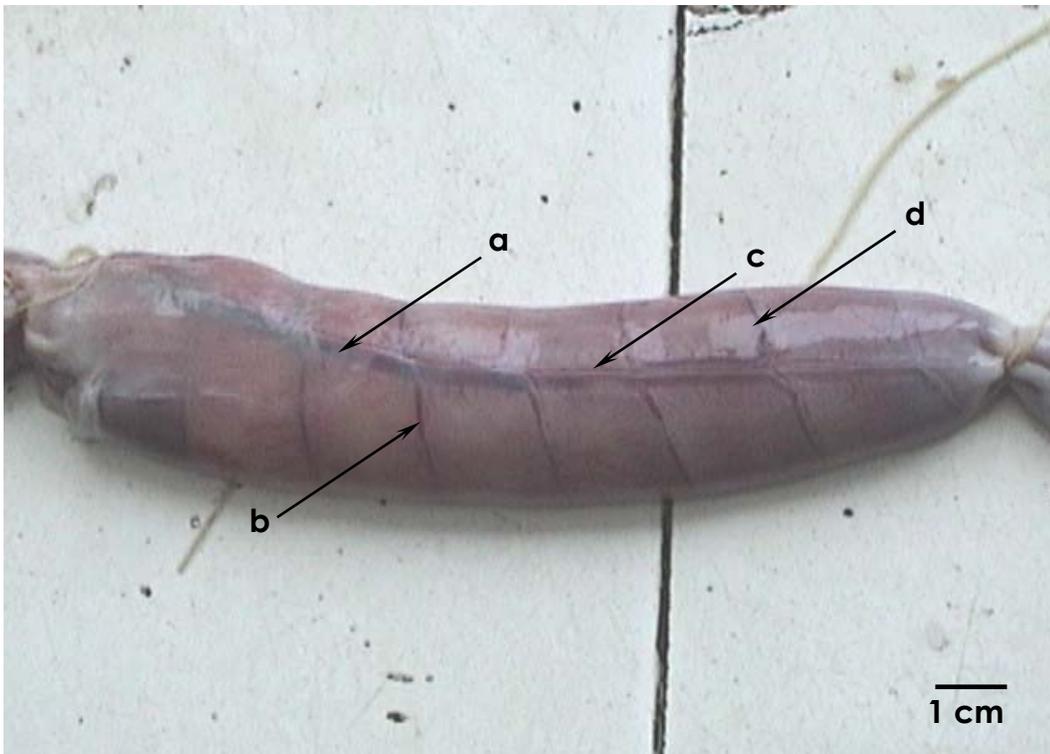
El intestino se ubica entre el estómago pilórico y el recto (Figura 4.5). Su longitud corresponde aproximadamente al 12% de la longitud total del cuerpo del individuo. Es un órgano alargado y fusiforme, cubierto por una pared, en cuyo interior se presenta un complejo sistema de cámaras (Figuras 4.6 y 4.7).



**Figura 4.5.** Vista externa de parte del tubo digestivo de *M. mento*. (a) Intestino, (b) estómago pilórico, (c) bazo (d), estómago cardíaco.

La superficie externa de la pared del intestino es lisa. Se aprecia un leve estrechamiento en los puntos de inserción de las espiras internas. Sobre la pared intestinal se destacan cuatro vasos sanguíneos principales, los cuales recorren el intestino en sentido longitudinal, dos de ellos por la región ventral y los otros dos por la dorsal. La región dorsal del intestino espiral es recorrida longitudinalmente por la arteria y vena intestinal posterior, también llamadas arteria o vena dorsal intestinal, una rama de la vena pancreático-mesentérica. Por otra parte, en la región ventral del

intestino se encuentran la arteria y la vena anterior intestinal, también dispuestas longitudinalmente. Estos cuatro vasos sanguíneos presentan ramificaciones perpendiculares al eje longitudinal del intestino, sobre los sitios de unión de la pared externa con las espiras (Figura 4.6).



**Figura 4.6.** Vista dorsal externa del intestino espiral de *M. mento*. (a) Vena dorsal intestinal, (b) ramificación de la vena dorsal intestinal, (c) arteria dorsal intestinal, (d) ramificación de la arteria dorsal intestinal.

La superficie interna de la pared intestinal presenta numerosos pliegues o evaginaciones a lo largo de toda su extensión, los cuales

aumentan la superficie de contacto con el alimento. Estos pliegues son de similares características a los que se observan sobre cada espira. La pared se proyecta hacia el interior dando origen a las espiras internas, que le dan el nombre al intestino espiral (Figura 4.7).

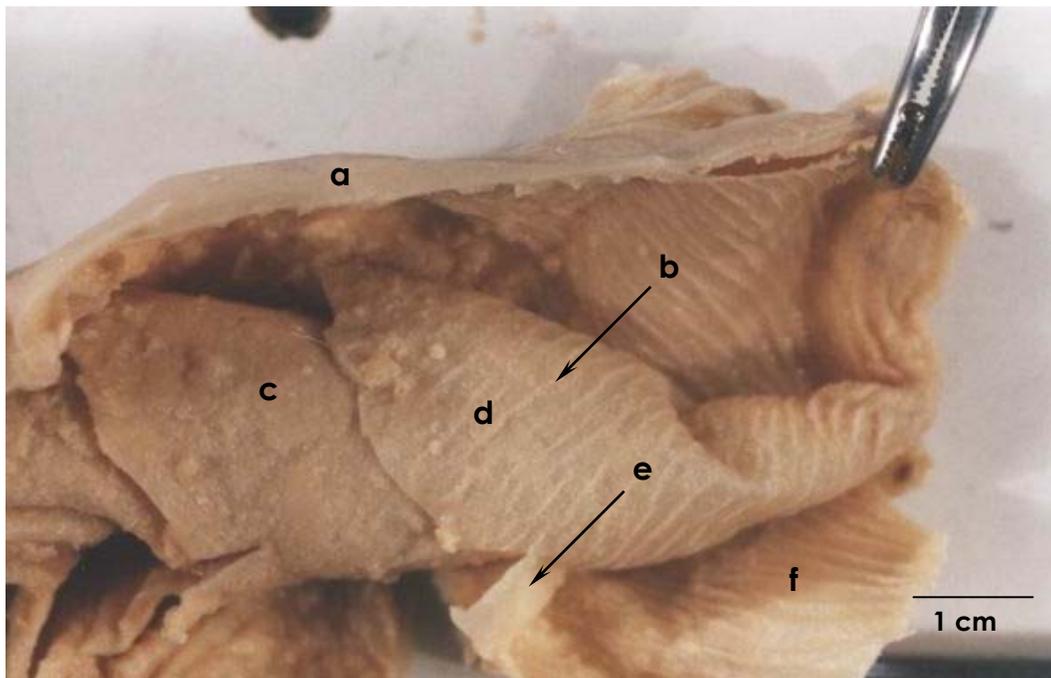
Según la estructura y disposición interna de las espiras (Figura 4.7), de acuerdo al criterio de Compagno (1988), se clasifica al intestino de *Mustelus mento* como conicoespiral, lo cual es un rasgo muy común en el Orden Carcharhiniformes, aunque hay excepciones.

La longitud total de las espiras internas, desde el ápice hasta la base del cono, va disminuyendo a medida que se avanza en sentido antero-posterior. Se ubican en serie, dejando un espacio reducido entre ellas, a través del cual circula el alimento para ser absorbido.

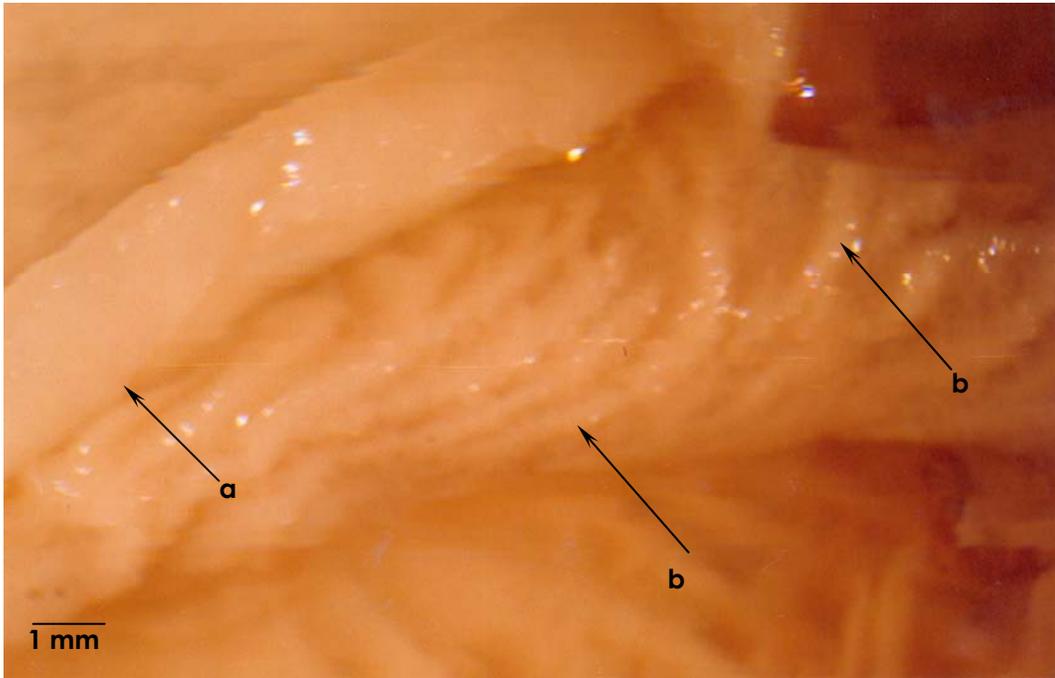
Los patrones de corrugación de la superficie de las espiras varían en y entre ellas. En las del extremo anterior se observa una serie de evaginaciones que se extienden formando líneas casi paralelas entre sí y distribuidas en forma oblicua con respecto al eje longitudinal del intestino (Figura 4.8). Este rasgo desaparece a medida que se avanza hacia las espiras de la región posterior (Figura 4.7).

Las espiras de la zona media y posterior del intestino presentan vellosidades más largas que las observadas en las primeras tres espiras, y dispuestas formando una red (Figura 4.9), por lo que ofrece una mayor superficie de contacto con el alimento, que a este nivel ya está digerido casi por completo.

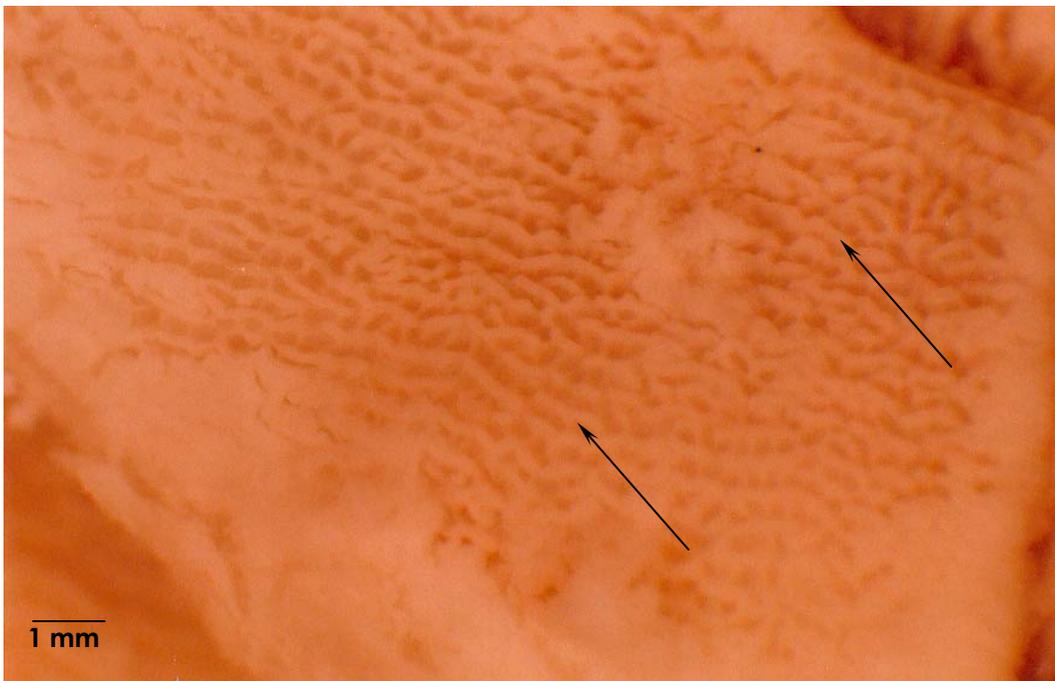
La superficie de las espiras de la región posterior o terminal, presentan vellosidades intestinales formando líneas con una misma orientación, unidas entre sí formando un entramado. Se observan criptas relativamente profundas.



**Figura 4.7.** Vista interna de la intestino espiral de *M. mento*. Se muestran las primeras dos espiras (a) Superficie externa de la intestino, (b) corrugaciones de la superficie interna de la pared del intestino, (c) segunda espira, (d) primera espira, (e) punto de unión de la primera espira a la pared externa de la intestino, (f) cara interna de la pared intestinal.



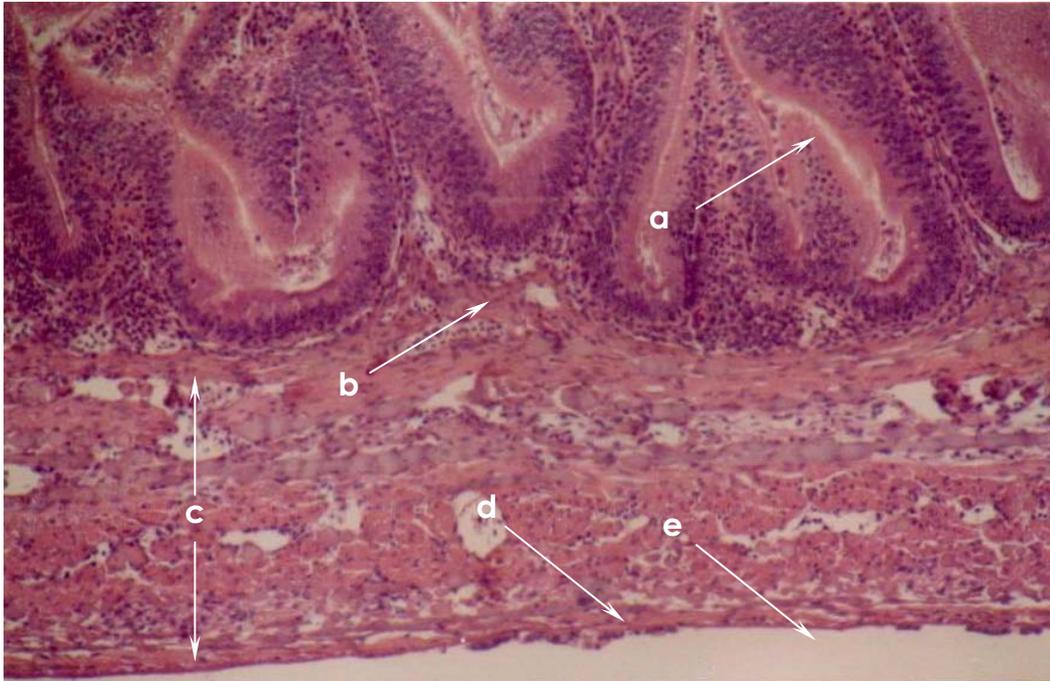
**Figura 4.8.** Primera espira del intestino de *M. mento*. (a) Parte de un parásito, (b) pliegues de la superficie intestinal(12x)



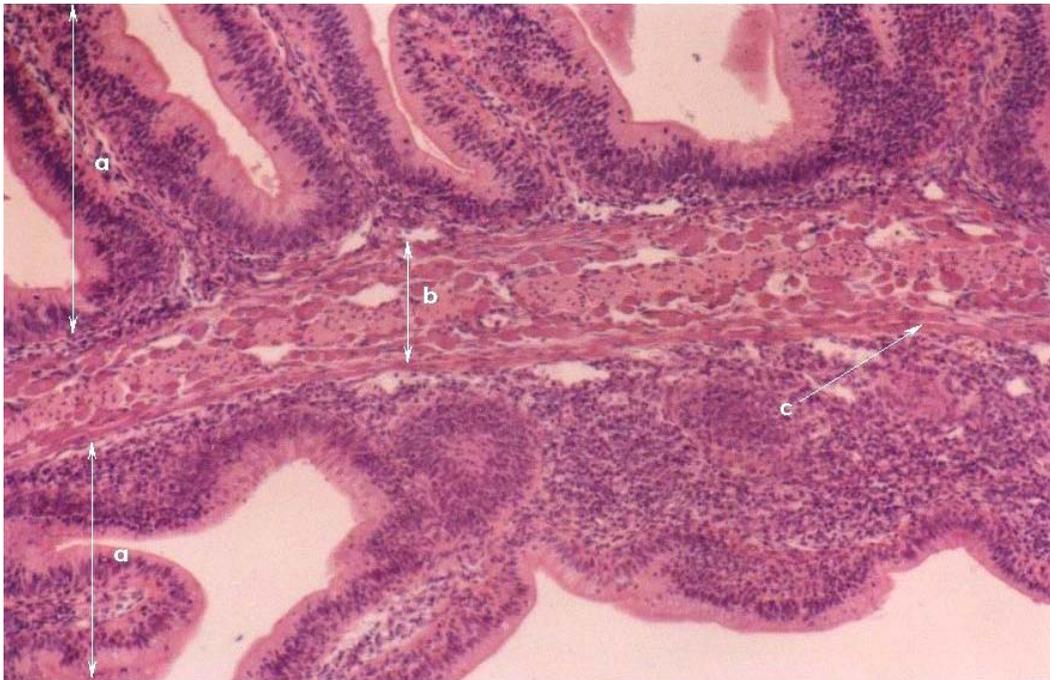
**Figura 4.9.** Superficie de la novena espira intestinal de *M. mento*. Se señalan las vellosidades intestinales (12x)

### **4.3. Observaciones microscópicas**

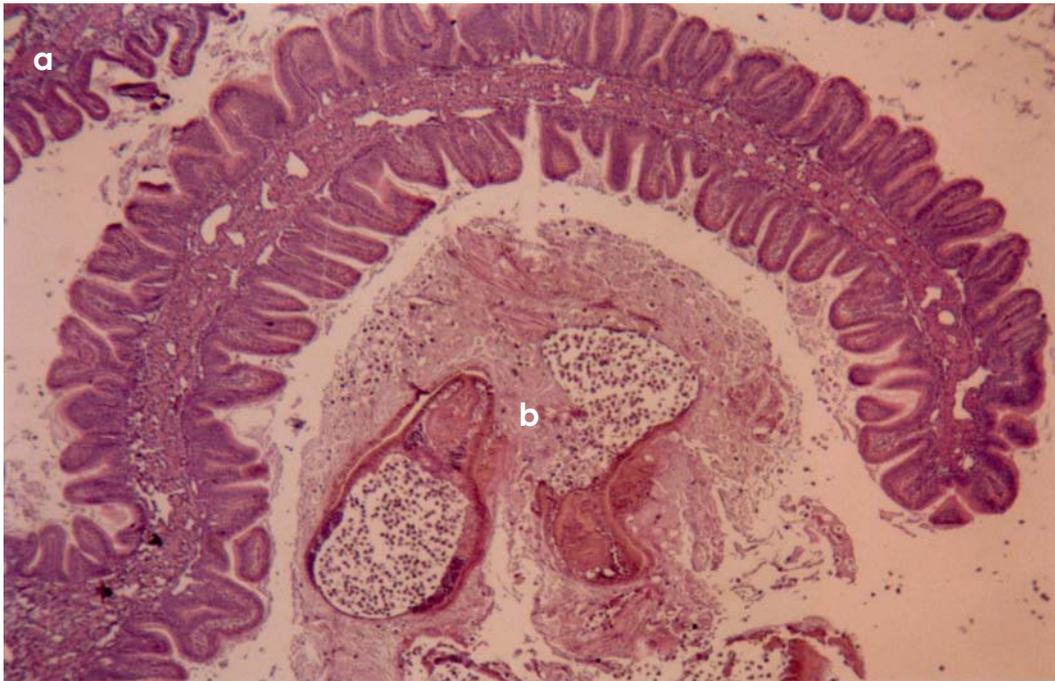
La pared intestinal está constituida principalmente por cinco capas concéntricas de tejido desde el lumen hasta la cara externa. Éstas son: la mucosa, la muscular de la mucosa, la submucosa, la conjuntiva y la serosa o adventicia (Figura 4.10). Las espiras internas presentan una constitución similar en cuanto a las capas de tejido que las componen hasta la submucosa. Sin embargo, como presentan epitelio absortivo por ambos lados, no hay una capa serosa o adventicia (Figura 4.11 y 4.12).



**Figura 4.10.** Corte transversal de la pared externa de la intestino espiral de *M. mento*. Se observan las distintas capas de tejido que la componen. (a) Epitelio, (b) muscular de la mucosa, (c) submucosa, (d) capa de tejido conjuntivo y (e) lámina serosa o adventicia (100x; HE).



**Figura 4.11.** Corte histológico en sexta espira intestinal de *M. mento*. Se muestra la doble capa de epitelio absortivo en las caras opuestas de ella. (a) Mucosa, (b) submucosa, (c) *muscularis mucosae*, (100x; HE).

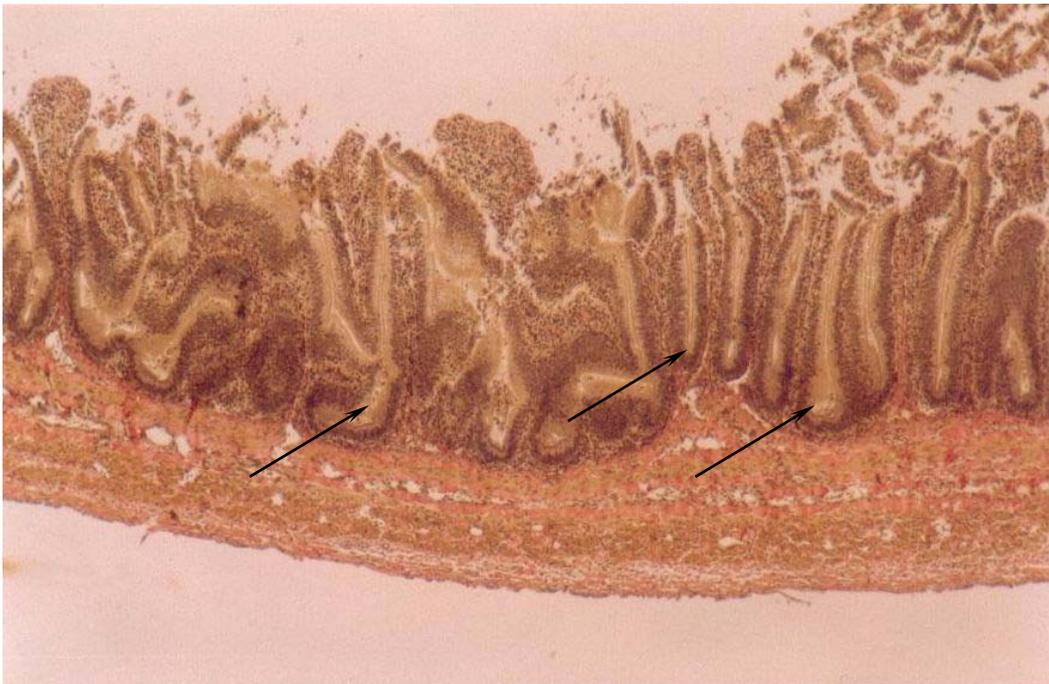


**Figura 4.12.** Corte transversal en la séptima espira interna. Se muestra el estrecho contacto con la pared externa del intestino(a), el lumen (b) y el enrollamiento de la espira sobre el eje longitudinal del intestino. (100x, HE)

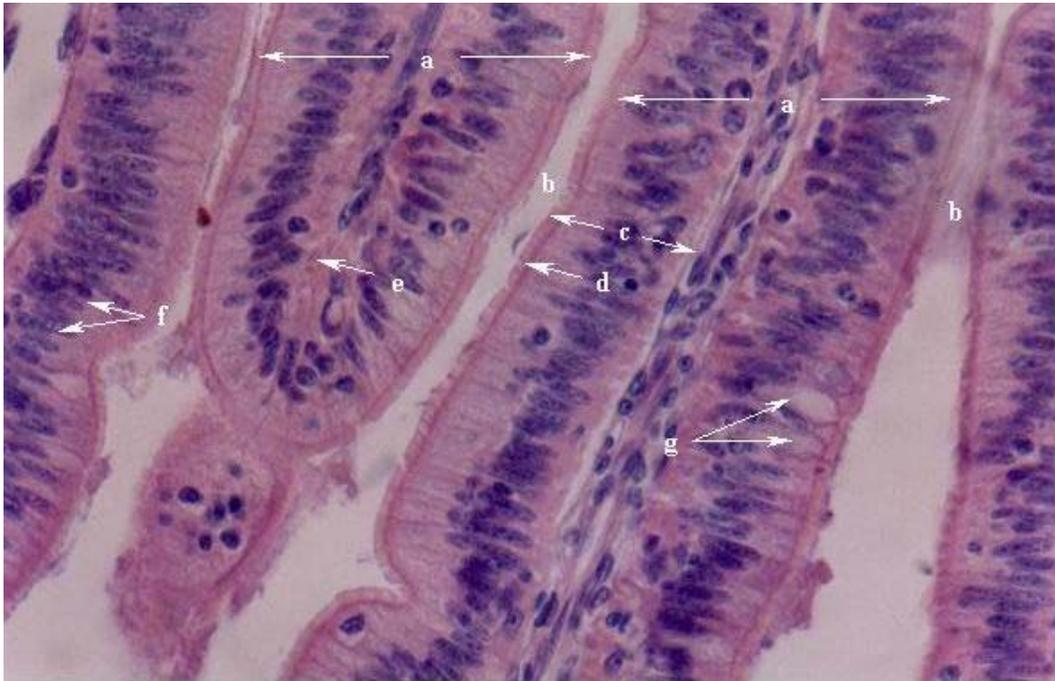
### 4.3.1. Mucosa

Es la capa de epitelio que se encuentra en contacto con el alimento en el lumen intestinal. Presenta vellosidades altas que forman criptas epiteliales profundas y de tamaño variable (Figura 4.13). El epitelio que cubre las vellosidades intestinales es monoestratificado y está formado por

células prismáticas y cilíndricas, encargadas de la función absortiva, y células caliciformes secretoras. Las células absortivas son muy numerosas, de forma cilíndrica y presentan ribete en cepillo y glucocálix en el margen apical. Su núcleo es alargado y se ubica en la región basal de la célula. Las secretoras están intercaladas entre las absortivas (Figura 4.14).



**Figura 4.13.** Corte histológico de pared externa del intestino espiral de *M. mento*. Se señalan las criptas epiteliales (40x, van Gieson).



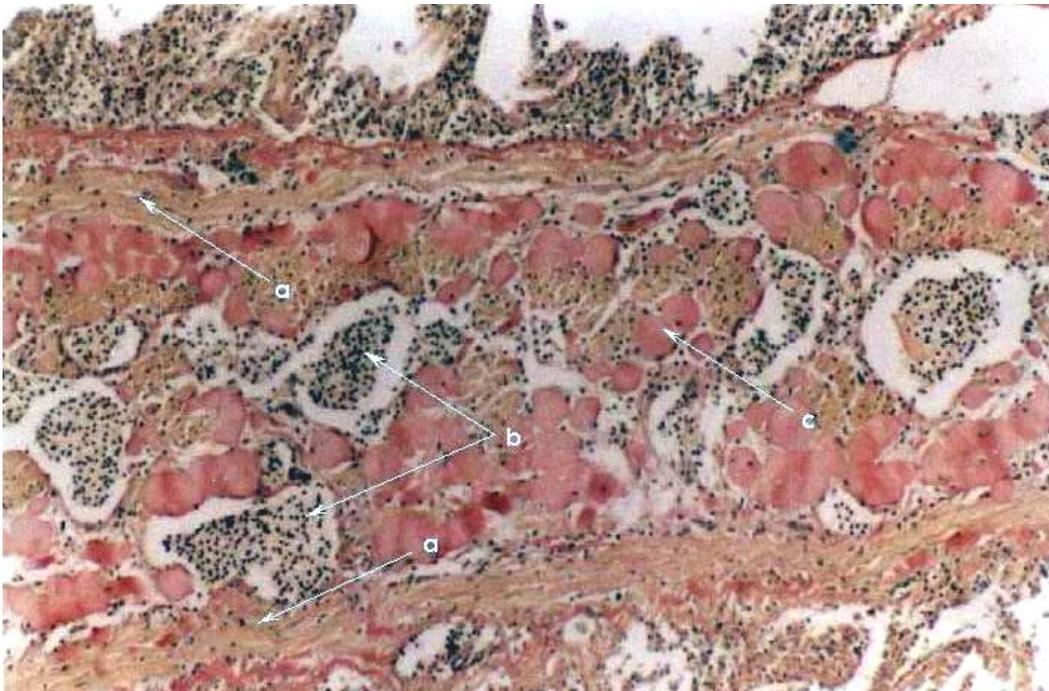
**Figura 4.14.** Corte transversal en tercera espira del intestino de *M. mento*. (a) Vellosidades intestinales, (b) criptas de la mucosa, (c) epitelio, (d) ribete en cepillo, (e) lámina propia, (f) células absortivas y (g) células caliciformes. (400x; HE).

Las células caliciformes son grandes y su núcleo está desplazado hacia la base de la célula por la gran cantidad de vesículas de secreción presentes en el citoplasma. El principal compuesto secretado por estas células es la mucina, glicoproteína que al hidratarse forma el mucus, sustancia lubricante. Se encuentran intercaladas irregularmente entre las células absortivas, con las cuales pueden presentar complejos de unión.

Bajo las células epiteliales se ubica la lámina propia o corion, capa muy celular que forma el estroma de las vellosidades (Figura 4.14). Está constituida por tejido conjuntivo laxo con abundante tejido linfoide,

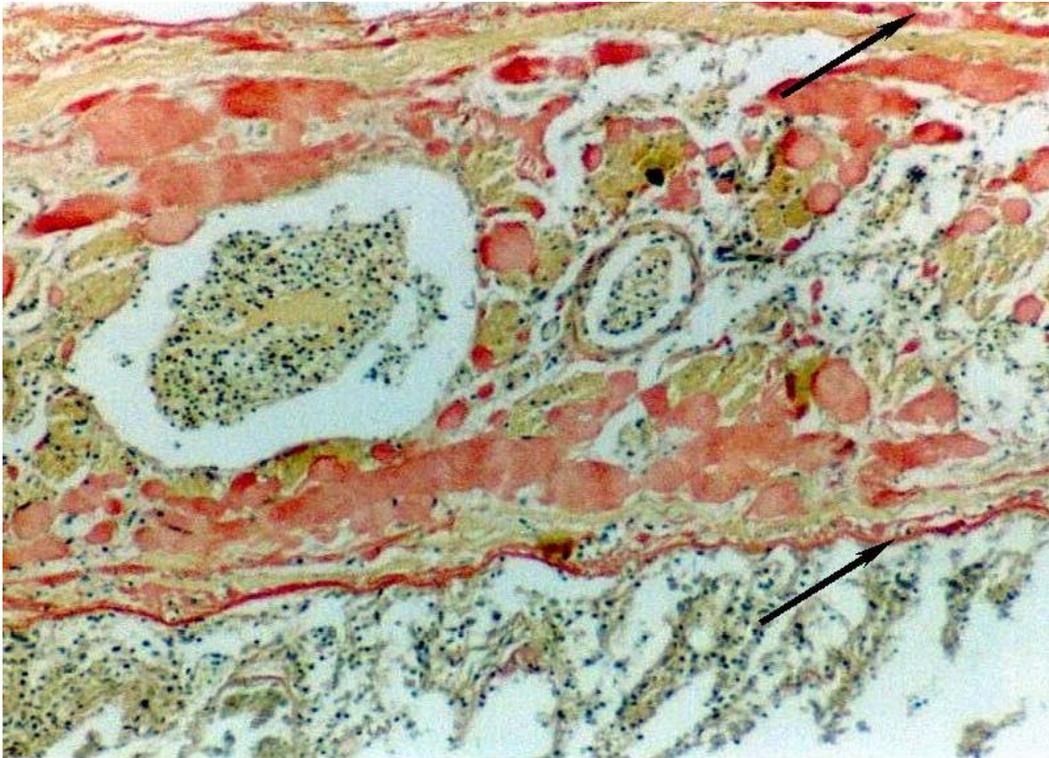
nodular o difuso. También se presentan vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios.

La última capa de tejido que compone la mucosa es la muscular de la mucosa o *muscularis mucosae* (Figura 4.15). Se trata de una delgada capa de musculatura circular que se encuentra bajo la lámina propia. Se encuentra a lo largo de todo el intestino.



**Figura 4.15.** Corte transversal en espira intestinal de *M. mento*. (a) Muscular de la mucosa, (b) vasos sanguíneos, (c) fibras colágenas (50x; van Gieson).

La capa de tejido conjuntivo se ubica entre el epitelio intestinal y la muscular de la mucosa. Está formada por tejido conectivo y le da el soporte a la lámina basal (Figura 4.16).



**Figura 4.16.** Submucosa de segunda espira de intestino en *M. mento*. Se señalan las capas de tejido conjuntivo (100x; van Gieson).

### **4.3.2. La submucosa**

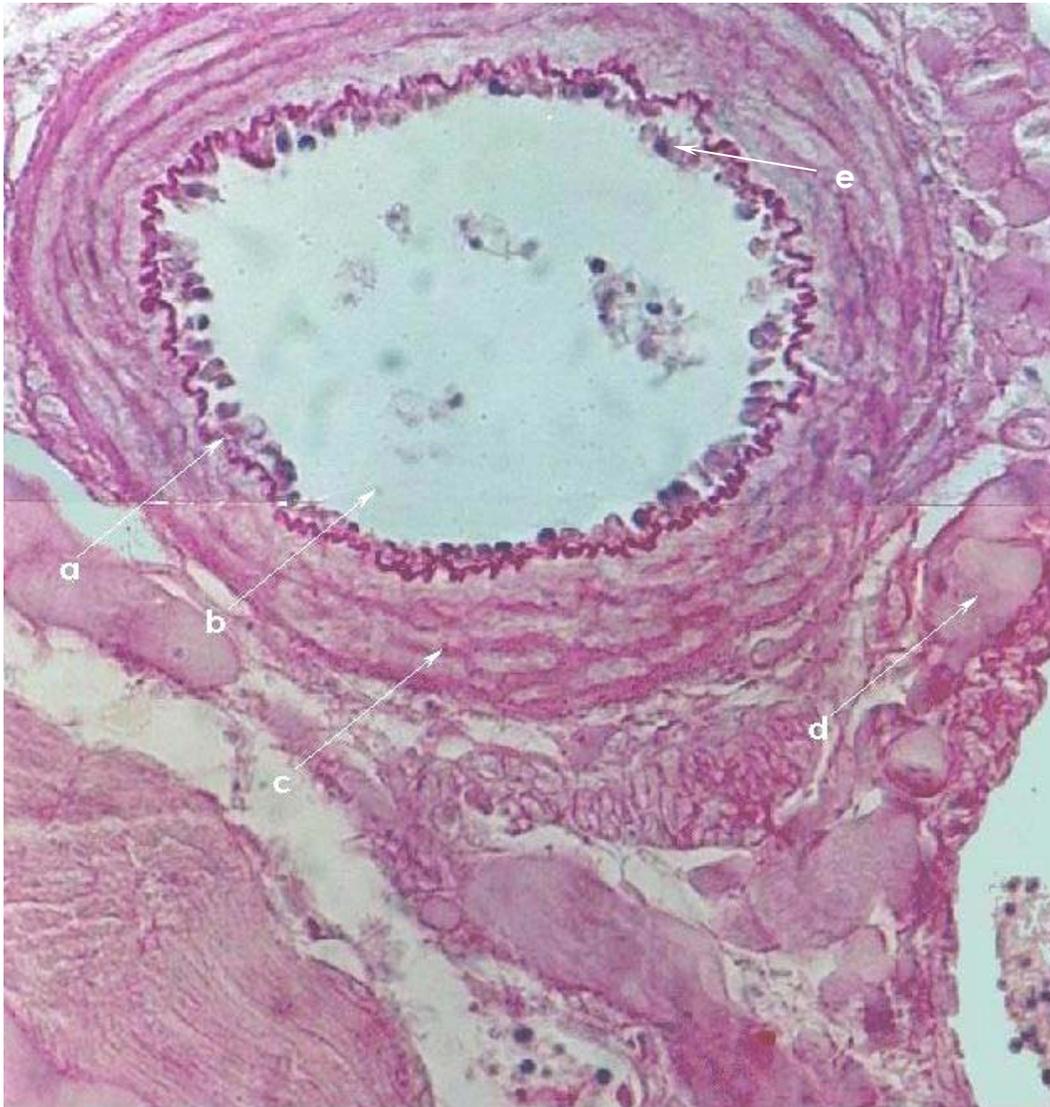
En la pared externa la submucosa se dispone entre la muscular de la mucosa y la capa de tejido conjuntivo que la separa de la serosa (Figura 4.10). En las espiras se ubica entre las dos musculares de la mucosa (Figura 4.11).

Está constituida principalmente por fibras colágenas y tejido muscular, entre los cuales se dispone una gran variedad de vasos sanguíneos de complejas paredes, con capas de musculatura circular y de tejido elástico (Figuras 4.17; 4.18). Contiene células adiposas, nódulos linfáticos, ganglios nerviosos involuntarios y nervios. El grosor de esta capa varía según la región intestinal.

En la submucosa se presentan también glándulas túbuloacinosas compuestas cuyos conductos excretores se abren en las criptas. Secretan mucus para proteger la mucosa. En el exterior, hay una capa delgada de epitelio simple sobre la cual se ubica la serosa o adventicia.



**Figura 4.17.** Submucosa intestinal de *M. mento*. (a) Muscular de la mucosa, (b) núcleo en fibra muscular, (c) manojos colágenos, (d) musculatura longitudinal, (e) conjuntivo (400x; van Gieson).



**Figura 4.18.** Arteria en tercera espira intestinal de *M. mento*. (a) Capa elástica interna, (b) lumen, (c) capa muscular entre fibras elásticas, (d) colágeno, (e) endotelio cuboidal. (100x; HE).

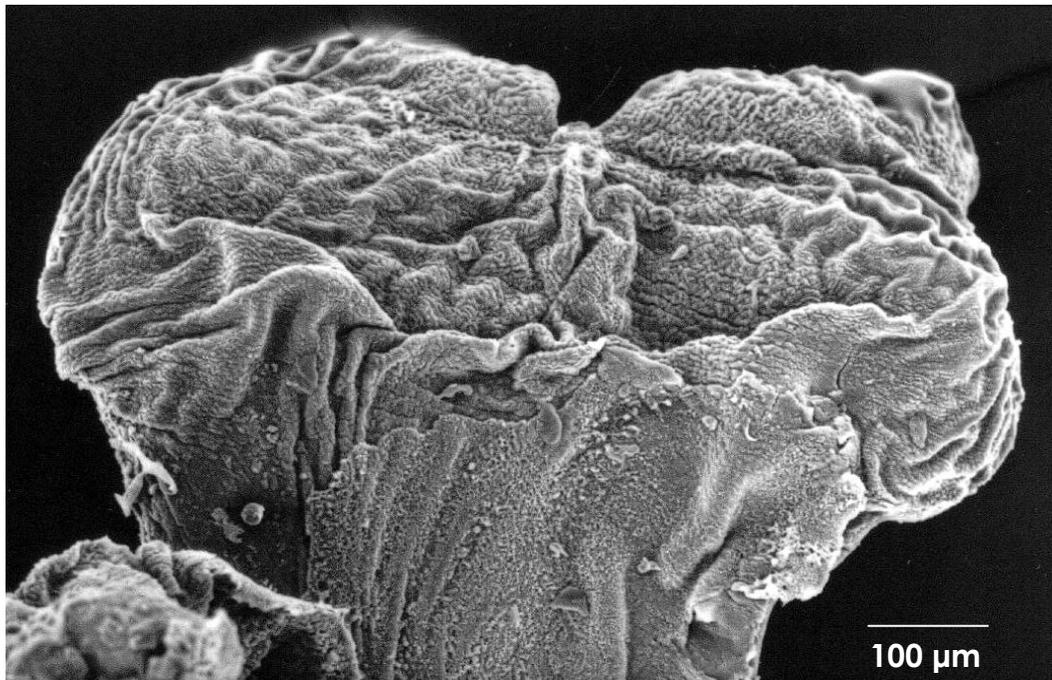
### 4.3.3. Determinación de parásitos

Se encontraron en total tres especies de céstodos tetrafilídeos fijados en el intestino de seis de los ocho ejemplares de *Mustelus mento* estudiados. Se determinó que éstas corresponden a *Orygmatobothrium musteli* (Figuras 4.19; 4.20), *Phyllobothrium lactuca* y *Calliobothrium verticillatum* (Figuras 4.21; 4.22).

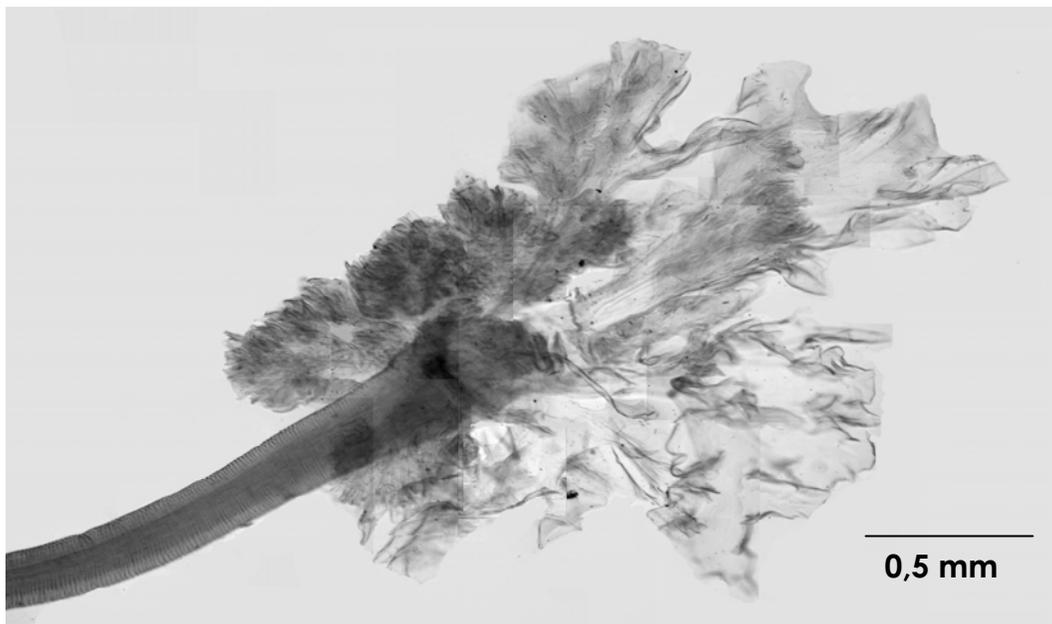
No se tomaron fotografías de los ejemplares de *Phyllobothrium lactuca*, porque fueron enviados de inmediato al Dr. Timothy Ruhnke de West Virginia College para realizar la secuenciación de ADN para estudios posteriores.

**Tabla 4.1.** Abundancia de parásitos céstodos en el intestino de cada ejemplar de *Mustelus mento* analizado.

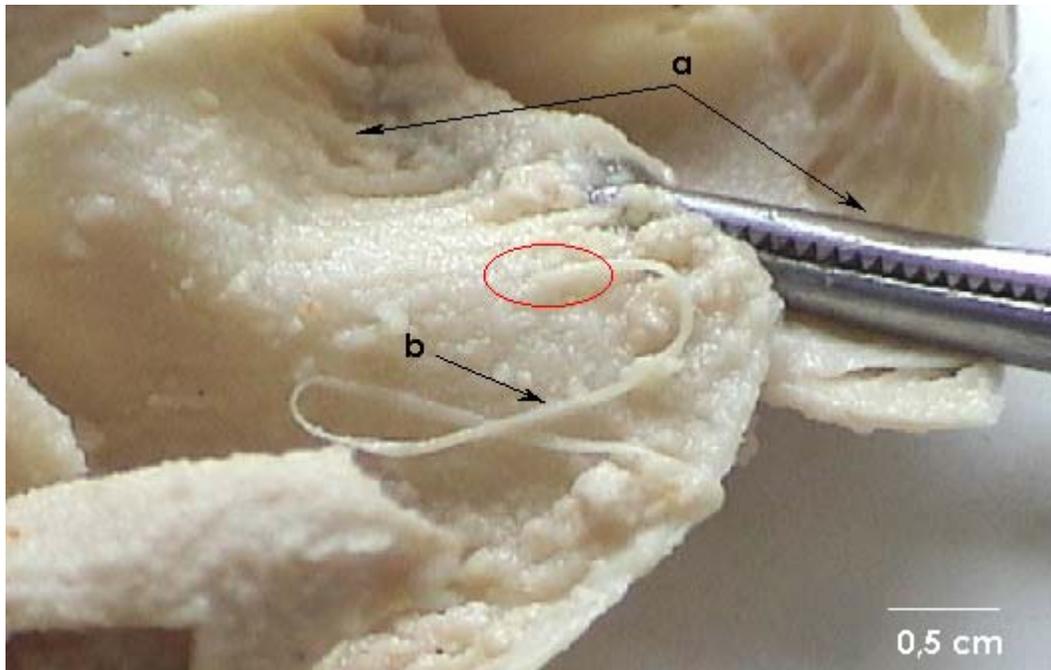
Hospedador	Parásitos		
	<i>O. musteli</i>	<i>P. lactuca</i>	<i>C. verticillatum</i>
Ejemplar 1	4	1	-
Ejemplar 2	3	2	2
Ejemplar 3	5	-	1
Ejemplar 4	3	-	-
Ejemplar 5	-	-	-
Ejemplar 6	-	-	-
Ejemplar 7	5	-	-
Ejemplar 8	5	-	-



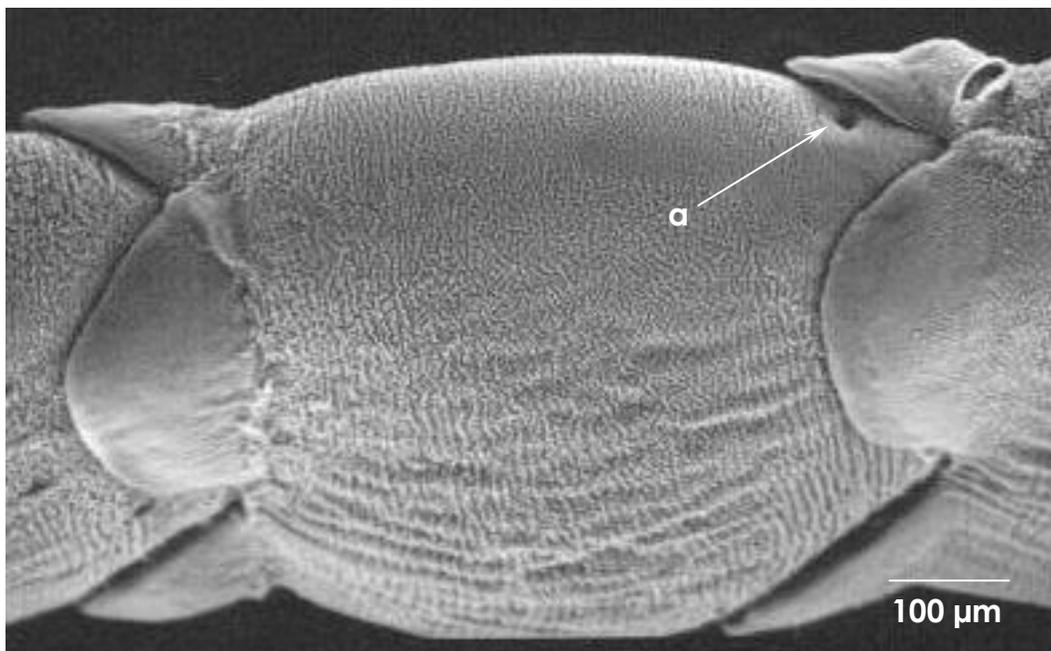
**Figura 4.19.** Microfotografía tomada con microscopio electrónico de barrido del escólex de *Orygmatobothrium musteli*, extraído del intestino de *M. mento*.



**Figura 4.20.** Montaje *in toto* de un ejemplar de la especie *Orygmatobothrium musteli* extraído del intestino de *M. mento*. Se muestra el escólex y primeras proglótidas.



**Figura 4.21.** Se muestra un ejemplar de *Calliobothrium verticillatum* fijado a la superficie de la tercera espira del intestino de *Mustelus mento*. El círculo señala el lugar en que el parásito se fija al hospedador; (a) pliegues internos de la superficie intestinal y (b) parásito.



**Figura 4.22.** Microfotografía electrónica de barrido de proglótida madura de *Calliobothrium verticillatum* encontrado en el intestino de *M. mento*. Se señala el poro genital (a).

## 5. Discusión

El mayor problema que ha motivado esta tesis de pregrado, y que se manifiesta tácitamente como uno de los principales objetivos, es la falta de información biológica e histológica en elasmobranquios chilenos.

Desde un punto de vista general, los antecedentes que aporta este estudio tienden a complementar el insuficiente conocimiento que aun existe sobre diversos aspectos básicos y específicos en la biología de los peces que componen la muy diversa ictiofauna chilena, hecho que ya ha sido discutido desde hace más de una década por autores tales como Pequeño (1989), Pequeño *et al.* (1990) y Sielfeld & Vargas (1992) y más recientemente por Rojas & Pequeño (1998) y Lamilla & Sáez (2003), entre otros. Este vacío de información sobre diversos aspectos biológicos y de distribución geográfica, junto con aspectos ecológicos, genéticos, conductuales y de los orígenes filogenéticos, tal como expresa Pequeño (2000) deberían complementarse con estudios de taxonomía y sistemática, disciplinas que son requisitos indispensables para el estudio de cualquier aspecto de la biología de los peces.

En pesquería, la composición de las capturas suele ser descrita en forma incompleta y la fiscalización estatal es insuficiente por falta de recursos tanto económicos como humanos. Esta situación no es ajena a

los condricios en general y se manifiesta de forma especial en rayas, que generalmente atraen menor atención de la opinión pública pese a que llegan a tener la misma o mayor importancia que otros tiburones en varias partes del mundo (Compagno 2002). En Chile existen 38 especies de batoideos (Lamilla & Sáez 2003), y las que son ingresados en las estadísticas pesqueras como “raya” corresponden a principalmente *Dipturus chilensis* y *D. trachyderma*, ya que las demás especies por lo general son descartadas.

Lo que ocurre con tiburones de hábitos pelágicos que son procesados o descartados, representa un problema que debe ser resuelto a la brevedad, ya que son estos los que presentan las menores tasas de crecimiento y reproducción, por lo que son más vulnerables a la pesca y menos capaces de responder en poco tiempo a la sobreexplotación.

Según estos antecedentes, es difícil evaluar el efecto real que se está produciendo en las poblaciones de elasmobranquios que sin ningún control están siendo extraídos constantemente.

*Mustelus mento*, que no representa un alto porcentaje de las capturas totales de peces en nuestro país está siendo explotado hace muchos años y su extracción ha decaído considerablemente en la última década (SERNAPesca 2002). No se ha especificado si esta disminución de

los desembarques se debe a que se ha disminuido el esfuerzo pesquero o a que las poblaciones de esta especie han recibido un fuerte impacto y están decreciendo.

Para lograr un uso sustentable de los recursos, se debe aumentar los conocimientos sobre sus hábitos e historia de vida. Los recursos no pueden ser manejados sin ser estudiados, y no pueden ser conservados sin manejarlos en base a datos de los más variados aspectos de su biología. Es importante crear la conciencia de que es la falta de información de aspectos biológicos de los tiburones chilenos la que ha incidido en forma negativa frente al desarrollo sustentable de la actividad extractiva en este grupo de peces.

*Mustelus mento* es conocido comúnmente como tollo en el ámbito pesquero. Sin embargo, no existe plena certeza de que todo lo informado con este nombre a las autoridades corresponda efectivamente a esta especie. Es importante destacar que esta situación no se origina necesariamente por el sector pesquero, sino que es un problema que abarca aspectos tan fundamentales como la educación ambiental y la capacitación, tanto de los fiscalizadores como de los pescadores. Al respecto, cabe señalar que Sielfeld & Vargas (1992) asocian el nombre

“tollo” a más de diez especies de distintos taxa, en base a propuestas personales y comunicación personal con pescadores.

Los resultados de este estudio son conocimientos morfológicos a distintos niveles del intestino espiral de *Mustelus mento*, que no están presentes en la literatura al nivel logrado en esta ocasión. Trabajos anteriores que incluyen aspectos de morfología, tales como Lagler (1984) y Nelson (1994), entre otros, están dirigidos, en su mayoría, a describir la anatomía externa del pez, por lo que la anatomía interna surge como un apoyo y alternativa a esta forma de identificar y clasificar a las especies. Recientemente Lamilla & Suárez (2003) señalan a este respecto que la taxonomía de los batoideos en el mundo han sufrido cambios drásticos desde el momento en que se empiezan a utilizar elementos de su morfología interna, tales como el análisis del condrocráneo y estructura interna de los órganos copuladores.

Existen otros aspectos que son muy poco conocidos con respecto al potencial uso que se le puede dar los tiburones y rayas que hasta ahora son desechados o cuyo aprovechamiento se limita sólo a la venta de aletas a mercados orientales. En algunos órganos de los tiburones existen compuestos químicos de uso terapéutico frente a diversas enfermedades progresivas del ser humano. La escualamina ha sido importante en la

industria de los fármacos dado su uso frente a enfermedades que presentan altos porcentajes de mortalidad. La diversificación de las terapias contra el cáncer junto con el descubrimiento de moléculas como la escualamina en tiburones surge como una alternativa muy efectiva y menos dañina que la cirugía y otras quimioterapias de alta toxicidad al representar una nueva forma de atacar los tumores, limitando su irrigación y previniendo de esta forma las metástasis o el crecimiento tumoral, lo cual ha hecho surgir un nuevo campo de investigación aún no explorado en Chile.

*Mustelus mento* pertenece a la Clase Chondrichthyes, grupo de peces que presenta diversas características y estructuras anatómicas consideradas como caracteres plesiomórficos para los gnatostomados y que a su vez los diferencia de otros grupos ícticos (Rasmussen & Arnason 1999a). Rasgos de la anatomía de condriktios, tales como el endoesqueleto cartilaginoso o la carencia de opérculo eran considerados, en un principio, como características anatómicas primitivas. Ya se señaló en la introducción que con biología molecular estas concepciones han ido variando para postular ideas diametralmente opuestas, como la que señala que los rasgos mencionados anteriormente corresponderían a la mantención de una típica condición embrionaria en el tiempo producto de un largo y lento proceso de evolución (Arnason *et*

al. 2001). Esto demuestra que con la aplicación de nuevas tecnologías se pueden cambiar antiguas concepciones erróneas con respecto a este grupo de peces.

Las primeras observaciones realizadas en el intestino de *Mustelus mento* tienen relación con la anatomía externa del mismo. Llama la atención que el alimento ingerido sea absorbido completamente en este corto trayecto. Su longitud mucho menor que la del intestino de otros vertebrados marinos y terrestres, que incluso podrían presentar dietas muy similares. En este sentido se puede inferir que la evolución guió la diferenciación de esta parte del tubo digestivo a favor del desarrollo en tamaño de otros órganos, principalmente del hígado, que toma gran importancia al dar mayor flotabilidad al pez junto con almacenar lípidos, carbohidratos y vitaminas (Lagler 1984).

En la superficie del intestino se observan la arteria y vena dorsal o posterior intestinal y por el lado opuesto la arteria y vena ventral o anterior intestinal, que se reúnen en la vena porta hepática. Estos vasos sanguíneos se ramifican sobre la unión de las espiras internas con la pared externa del intestino, proporcionando una fuerte irrigación sanguínea, la cual es necesaria para el transporte de los nutrientes que allí se absorben.

En el interior del intestino se observan las espiras cuyo número varía según la especie. En *Mustelus mento* hay nueve espiras. Cada una de ellas presenta vellosidades en ambas caras, aumentando notablemente la superficie de contacto con el alimento. A lo largo de estos pliegues se van produciendo las últimas absorciones de los nutrientes. Por su parte, la pared intestinal, que envuelve el conjunto de espiras, presenta una superficie interna de similares características a la de las espiras a medida que se avanza en sentido antero posterior. La variación en la altura de las vellosidades y los patrones de corrugación de la superficie indican que no se absorben los mismos compuestos a lo largo de todo el intestino, sino que habría una compartimentalización de la absorción de nutrientes.

El tubo digestivo es un sistema que involucra varias secciones, cada una de ellas con una función específica. La morfología tanto a nivel macro como microscópico va a estar condicionada al tipo de alimentación de los individuos. De esta manera, en los tiburones tenemos dos estómagos: el primero con una fuerte labor mecánica y el otro más dedicado a la digestión y absorción de lípidos. A continuación se dispone el intestino, como en los demás grupos de vertebrados "superiores", pero que a diferencia de otros presenta una variante morfológica que se conoce con el nombre de intestino espiral. Este tipo de intestino con su compleja morfología interna es muy importante en el éxito evolutivo de los

condictios. Como ya se señaló en la introducción, un intestino que ocupa poco espacio en el abdomen del pez permite tener un mayor desarrollo de otros órganos internos. Un hígado muy grande en comparación al de otros vertebrados les proporciona mayor flotabilidad, que a la vez representa un menor gasto de energía para mantenerse a determinada profundidad, tomando en cuenta que los tiburones presentan boyantez o flotabilidad negativa.

La histología del intestino, ha sido generalmente descrita con mayor detalle en mamíferos y entrega información que puede ser utilizada como apoyo a la comprensión de las funciones fisiológicas que cumple. En este sentido se considera como un aporte valioso el entregar detalles estructurales tan finos en tiburones chilenos y que en un futuro puedan ayudar a comprender el metabolismo de las microestructuras intestinales.

El uso de técnicas histológicas permitió conocer la anatomía intestinal interna en mayor profundidad. Se observan cinco capas básicas de tejido, que se mantienen a lo largo de todo el intestino, variando sólo en grosor.

Se han observado diferencias muy notorias en el epitelio y capa submucosa del intestino de *Mustelus mento* con respecto a estudios en dos especies chilenas del género *Dipturus* (resultados no publicados). El

epitelio absortivo en *D. chilensis* presenta varias capas de células, a diferencia de lo descrito en *Mustelus mento* que presenta un epitelio pseudoestratificado. Por otra parte, la distribución de fibras colágenas en la submucosa es diferente en ambas especies, no encontrándose en la raya los gruesos manojos colágenos encontrados en *Mustelus mento*. Los vasos sanguíneos son más parecidos entre ambas especies, encontrándose en la raya vasos de variados calibres y complejidad estructural de sus paredes.

Es importante comparar la anatomía interna de especies del Orden Rajiformes y Carcharhiniformes dada la gran diferencia en sus anatomías externas y por ser integrantes de dos grupos separados dentro del grupo de los Neoselachii, que abarca a todos los elasmobranquios vivientes Compagno (2002).

Sigue pendiente la tarea de profundizar en la caracterización morfológica del intestino espiral de *Mustelus mento* a nivel molecular. Se espera en el futuro poder complementar el presente estudio con microscopía electrónica, tanto de transmisión como de barrido, para definir las diferencias que pudieran existir entre las espiras, tanto en su superficie como en sus capas internas. Por otra parte, la microscopía electrónica de transmisión permitirá determinar con mayor certeza a qué

nivel correspondería la unión entre los parásitos y el hospedador, y así definir si sólo se trata de una unión mecánica de anclaje tipo llave cerradura o si están involucrados complejos de unión más específicos.

Aunque la morfología del intestino no sea un carácter taxonómico de uso práctico en la identificación específica, precisar las características de su superficie va a ayudar a comprender de mejor manera el por qué de la especificidad parasitaria que se da entre céstodos y elasmobranquios y, sobre la base de ello, profundizar posteriormente en estudios de biogeografía, ecología y evolución.

Otro aspecto importante que permite confirmar lo señalado anteriormente por Carvajal (1974), Williams *et al.* (1992), Escalante & Carvajal (1981), Caira (1990), Olson *et al.* (1999), Knoff *et al.* (2001) y Suriano & Labriola (2001), es el de la identificación de los parásitos céstodos encontrados en el intestino, y así considerar a los parásitos y al hospedador como parte de una asociación, que se mantiene estable desde hace mucho tiempo, por lo que permite realizar inferencias respecto a la evolución del hospedador con respecto a otras especies que comparten características morfológicas externas similares y que habitan en otros lugares del mundo. En esta materia se han logrado avances importantes por autores como Olson *et al.* (1999), Ruhnke (1996) y

Ruhnke *et al.* (2000), por citar algunos, ocupando herramientas como la biología molecular para poder establecer los conceptos y cambios que han ocurrido en el campo de la filogenética molecular.

Los parásitos encontrados en los ejemplares de *M. mento* analizados para la realización de esta tesis confirmaron las determinaciones hechas previamente por Carvajal (1974). Sin embargo, se debe tener en cuenta que el objetivo de determinar parásitos intestinales en *M. mento*, es para agregar un rasgo estable a su identificación, y por consiguiente a su clasificación. En este sentido cabe señalar que ninguno de los parásitos encontrados en el intestino de *M. mento* son especie específicos al hospedador mencionado.

Suriano & Labriola (2001) señalan que van Beneden (1850) describiría una especie nueva de tetrafilideo parásito de *Mustelus mustelus*, este nuevo parásito sería conocido como *Anthobothrium musteli* hasta 1889, año en que según las mismas autoras, Zschokke lo reubicaría en el género *Orygmatobothrium*. Euzet (1959) redescubre a *O. musteli*, considerada la especie tipo del género, a partir de muestras extraídas del mismo hospedador. Brickle *et al.* (2001) registra la presencia de este parásito en el intestino de *Mustelus asterias*, especie distribuida en el Atlántico norte (Compagno 1984b). No obstante lo anterior, *O. musteli* ha sido encontrado,

hasta la fecha, sólo en tiburones del género *Mustelus*, ya sean del Atlántico norte o del Mar Mediterráneo, por lo que en Chile puede ser utilizado como indicador de *Mustelus mento*, ya que existe especificidad a nivel de género.

La especie *Phyllobothrium lactuca*, es la que presentó mayores dificultades para su estudio. El género *Phyllobothrium* ha sufrido muchos cambios en lo que respecta al número de especies que incluye. Ruhnke (1996) en un esfuerzo por establecer un criterio fijo en la identificación de especies de este género señala que los parásitos deben cumplir tres características estructurales básicas para ubicarse dentro de este género: a) tener cuatro botridios bífidos en el escólex, b) presencia de órgano glandular apical en el escólex y c) presencia de esfínter vaginal muscular en el poro genital de las proglótidas. De esta manera se ha podido detener la circulación de especies por este género, que había sido un receptáculo de otras especies que no cabían en los demás taxa (Wardle & McLeod. 1952).

*Phyllobothrium lactuca* fue identificado por Brickle *et al.* (2001) en *Mustelus asterias* y Aragort (2003) lo encuentra en varias especies del género *Raja*. Este último antecedente no corresponde a una publicación sometida al arbitraje de un comité evaluador de alguna revista científica,

por lo que no será considerado en esta tesis para evaluar la importancia de este parásito como indicador biológico del género *Mustelus*, o como señala Ruhnke (1996) para especies de la Familia Triakidae.

La tercera especie de parásito presente en el intestino de *M. mento* es *Calliobothrium verticillatum*, que según Cherry *et al.* (2003) está presente también en *Mustelus canis*. Este parásito se caracteriza por poseer tres ventosas en cada botridio en la etapa de adulto (Cherry *et al.* 2003). El hecho de no haber sido encontrado parasitando en especies de otros géneros de elasmobranquios, lo avala como buen indicador biológico. Sin embargo, fue una especie de baja importancia relativa con respecto a *Orygmatobothrium musteli*.

## 6. Conclusiones

La biología de muchas especies de elasmobranquios sigue siendo poco conocida y más aún la de las especies chilenas, que conforman un grupo muy diverso. Es importante estudiar la anatomía interna de *Mustelus mento*, tanto por la falta de antecedentes biológicos sobre esta especie, como por ser parte del Orden Carcharhiniformes, grupo que incluye al 56% de todos los tiburones vivientes.

Uno de los logros obtenidos a través de este estudio es la descripción del intestino espiral de *Mustelus mento* a nivel macroscópico y microscópico. Con esto se aporta a un área de investigación que en elasmobranquios ha sido poco estudiada.

Los métodos propuestos para el procesamiento de las muestras, si bien permitieron obtener buenos resultados para el objetivo de observar y describir la pared del intestino a nivel macroscópico y microscópico, dejaron en evidencia la necesidad de continuar investigando la ultra estructura, biología molecular y bioquímica, tanto de los tejidos de la pared intestinal como la de los parásitos que en ella se hospedan. Además, los resultados obtenidos crean interrogantes sobre la fisiología digestiva de la especie en estudio con respecto a otros peces que viven en el mismo ambiente y comparten los mismos ítemes alimentarios.

Los resultados indicaron que existen diferencias a nivel de la superficie de las espiras y con respecto a la estructura interna de éstas, que están dadas por la importancia relativa de las capas o estratos que componen las espiras y no corresponden a la presencia o ausencia de alguna de estas capas.

Las diferencias a nivel histológico se expresan en el grosor de la mucosa y características de la submucosa. Estas diferencias morfológicas distinguen a *Mustelus mento* de otros elasmobranquios. Sin embargo, para que los aspectos morfológicos de las espiras intestinales sirvan como carácter anatómico de identificación, se debiera complementar estos resultados con la morfología del intestino de otras especies del mismo género.

La constitución de la parasitofauna observada entre las espiras intestinales de *Mustelus mento*, en la que el grupo dominante es el Orden Tetrphyllidea, demostró que existen diferencias muy notables en relación a lo que se ha observado en otros grupos de elasmobranquios chilenos, tales como *Dipturus chilensis* y *D. trachyderma*, en las cuales son dominantes especies del Orden Trypanorhyncha. Sin embargo, se observaron similitudes con respecto a los parásitos encontrados por otros investigadores en ejemplares del género *Mustelus* capturados en distintas partes del mundo.

Se concluye que son buenos indicadores específicos de *Mustelus mento* los céstodos *Orygmatobothrium musteli* y *Calliobothrium verticillatum*. No existen evidencias suficientes para señalar que *Phyllobothrium lactuca* no es un buen marcador biológico para tiburones del género *Mustelus*, por lo que comparte la condición señalada anteriormente con los otros céstodos estudiados en *Mustelus mento* durante la realización de esta Tesis.

## 6. Literatura citada

- **Acuña E, JC Villarroel & R Grau. 2002.** Fauna íctica asociada a la pesquería de pez espada (*Xiphias gladius* Linnaeus). *Gayana* 66(2): 263-267.
- **Aragort W. 2003.** Parasitofauna en rayas de la plataforma continental de la ría de Muros y Noya. Seminarios CENIAP. Venezuela.
- **Arnason U, A Gullberg & A Janke. 2001.** Molecular phylogenetics of gnathostomous (jawed) fishes: old bones, new cartilage. *Zoologica Scripta* 30(4): 249 – 255.
- **Bahamonde & Pequeño. 1975.** Peces de Chile. Lista Sistemática. Museo Nacional de Historia Natural, Publicación Ocasional 21:1-20.
- **Benson AJ, M<sup>c</sup> Farlane & JR King. 2001.** A phase “0” review of elasmobranch biology, fisheries, assessment and management. Canadian Science Advisory Secretariat, research document 2001/129.
- **Bigelow HB & WC Schroeder. 1953.** Fishes of the Gulf of Maine. Fishery Bulletin 74. 577 pp.
- **Borucinska J & JN Caira. 1993.** A comparison of mode of attachment and histopathogenicity of four tapeworm species representing two Orders infecting the spiral intestine of the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. *Journal of Parasitology* 79(2): 238 – 246.

- **Brickle P, P Olson, D Timothy, J Littlewood, A Bishop & A Arkhipkin. 2001.** Parasites of *Loligo gahi* from waters off the Falkland Islands, with a phylogenetically based identification of their cestode larvae. *Canadian Journal of Zoology* 79: 2289 - 2296.
- **Caira J. 1990.** Metazoan parasites as indicators of elasmobranch biology. *In* Elasmobranch as living resources: Advances in the biology, ecology, systematics and the status of the fisheries (HL Prau Jr, SH Gruber & T Taniuchi, eds.) NOAA Technical Report 90.
- **Cancino C & R Meléndez. 2000.** Comentarios sobre el seminario-taller Sistemática filogenética y biogeografía de peces marinos de Chile. *Estudios Oceanológicos* 19: 137 - 141.
- **Cao Y, P Waddell, N Okada, and M Hasegawa. 1998.** The complete mitochondrial DNA sequence of the shark *Mustelus manazo*: Evaluating rooting contradictions to living bony vertebrates. *Molecular Biology and Evolution* 15(12):1637–1646.
- **Carvajal J. 1974.** Records of cestodes from Chilean sharks. *The Journal of Parasitology* 60(1): 29 - 34.
- **Carvajal J & G Ruiz. 1987.** Fijación de dos especies de *Acanthobothrium* (Cestoda: Tetraphyllidea) a la válvula espiral de rayas del género *Sympterygia*: Estudio de la interfase parásito-huésped. *Parasitología al Día* 11: 49-55.

- **Cherry B, A Neese, R Bullis & G Schad. 2003.** Investigations into the life cycle of *Calliobothrium verticillatum*, a tapeworm of *Mustelus canis*. The Biological Bulletin 181 (2): 358
- **Compagno L. 1984a.** Sharks of the world. Part 1. Hexanchiformes to Lamniformes. FAO Species Catalogue Vol. 4, FIR/S. 125pp.
- **Compagno L. 1984b.** Sharks of the world. Part 2. Carcharhiniformes. FAO Species Catalogue Vol. 4, FIR/S: 125 - 630.
- **Compagno LJ. 1988.** Sharks of the order Carcharhiniformes. Princeton University Press, Princeton, Nueva Jersey. 467 pp.
- **Compagno L. 2002.** Sharks of the World. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. Volume 2 bullhead, mackerel and carpet sharks (Heterodontiformes, Lamniformes and Orectolobiformes). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma 269 pp.
- **Crow G, J Howe, S Uchida, S Kamolnick, M Wisner & J Caira. 1990.** Protrusion of valvular intestine through the cloaca in sharks of the family Carcharhinidae. Copeia 1990(1): 226-229.
- **Culling CF. 1974.** Handbook of Histopathological and Histochemical Techniques (including museum techniques). Butterworth & CO. (Publishers) Ltd. Third edition. 712 pp.

- **De Buen (1959).** Lampreas, tiburones, rayas y peces en la Estación de Biología Marina de Montemar, Chile. *Revista de Biología Marina, Valparaíso* 9 (1-3):1-200.
- **Delfín 1901.** Catálogo de los peces de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 3-4 (1899- 1900). 133 pp.
- **Escalante H & J Carvajal. 1981.** Céstodos tetrafilíidos de peces del género *Mustelus* en la costa peruana. *Boletín Chileno de Parasitología* 36: 76-78.
- **Euzet L. 1959.** Recherches sur les cestodes tétraphyllides des sélaciens des côtes de France. Thèse de la Faculté des Sciences de Montpellier, Montpellier, Francia. 263 pp.
- **Evans D. 2000.** Vasoactive receptors in abdominal blood vessels of the dogfish shark, *Squalus acanthias*. *Physiological and Biochemical Zoology* 74(1): 120–126.
- **Evans DH & PM Piermarini. 2001.** Contractile properties of the elasmobranch rectal gland. *The Journal of Experimental Biology* 204: 59–67.
- **Fowler 1942-43.** Fishes of Chile, Systematic Catalog, Part II, *Revista Chilena de Historia Natural* 46-47: 15-116, 275-350.

- **Fowler HW 1941.** Fishes of Chile, Systematic catalog. Part I, Revista Chilena de Historia Natural 45:22-57.
- **Frisk MG, TJ Miller & MJ Fogarty. 2001.** Estimation and analysis of biological parameters in elasmobranch fishes: a comparative life history study. Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences 58: 969-981.
- **Gay C. 1848.** Historia Física y Política de Chile, Zoología Tomo 2. 372 pp.
- **Grogan ED, R Lund & D Didier. 1999.** Description of the chimaerid jaw and its phylogenetic origins. Journal of Morphology 239: 45–59.
- **Heist EJ. 1999.** A review of population genetics in sharks. American Fisheries Society Symposium 23: 161 – 168.
- **Knoff M, S Carmona de São Clemente, R Magalhães & D Corrêa. 2001.** Digenea and Acanthocephala of elasmobranch fishes from the southern coast of Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 96(8): 1095-1101.
- **Lagler KF, JE Bardach, RW Miller & D Passino. 1984.** Ictiología. México: AGT Editor. 489 pp.

- **Lamilla J. & S Sáez. 2003.** Clave taxonómica para el reconocimiento de especies de rayas chilenas (Chondrichthyes: Botoidei). Investigaciones Marinas, Valparaíso, 31(2): 3-16.
- **Leake L. 1975.** Comparative Histology. An introduction to the microscopic structure of animals. Academic Press Inc. (Londres) Ltd. 738 pp.
- **Leonard JB, AP Summers & TJ Koob. 1999.** Metabolic rate of embryonic little skate, *Raja erinacea* (Chondrichthyes: Batoidea): The cost of active pumping. Journal of Experimental Zoology 283: 13 – 18.
- **Li D, J Williams & R Pietras. 2002.** Squalamine and cisplatin block angiogenesis and growth of human ovarian cancer cells with or without HER-2 gene overexpression. Oncogene 21: 2805-2814.
- **Mann 1954.** Vida de los peces en aguas chilenas. Instituto de Investigaciones Veterinarias y Universidad de Chile, Santiago, 342 pp.
- **Mayes M, D Brooks & T Thorson. 1978.** Two new species of *Acanthobothrium* van Beneden 1849 (Cestoidea: Tetracanthocephala) from freshwater stingrays in Southamerica. The Journal of Parasitology 64(5).
- **Mc Manus JF & RW Mowry. 1960.** Staining Methods. Histologic and Histochemical. Paul B Hoeber, Inc. Medical Division of Harper & Brothers Nueva York. 423 pp.

- **Molina J I. 1782.** Saggio sula Storia Naturale del Cile, Bologna. 367 pp.
- **Motta PJ, RE Hueter, TC Tricas & AP Summers. 2002.** Kinematic analysis of suction feeding in the nurse shark *Ginglymostoma cirratum* (Orectolobiformes, Ginglymostomatidae). *Copeia* 2002(1): 24 – 38.
- **Motta PJ, TC Tricas, RE Hueter & AP Summers. 1997.** Feeding mechanism and functional morphology of the jaws of the lemon shark *Negaprion brevirostris* (Chondrichthyes, Carcharhinidae). *The Journal of Experimental Biology* 200: 2765-2780.
- **Musick JA, G Burgess, G Cailliet, M Camhi & S Fordham. 2000.** Management of sharks and their relatives (Elasmobranchii). *Fisheries* (25): 9-13.
- **Nelson. 1994.** *Fishes of the world* (3<sup>rd</sup> Edition). John Wiley Sons, Inc. Nueva York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapur. 600 pp.
- **Olson P D, T Ruhnke, J Sanney & T Hudson. 1999.** Evidence for host – specific clades of tetraphyllidean tapeworms (Platyhelminthes: Eucestoda) revealed by analysis of 18S ssrDNA. *International Journal of Parasitology* 29(9): 1465 – 1476.
- **Pears AGE. 1960.** *Histoquímica Teórica y Aplicada*. Aguilar S.A. de Ediciones, Madrid. Versión española de Tomás Palomo Salas. 599 pp.

- **Pequeño G, J Rucabado & D Lloris. 1990.** Tiburones comunes a las costas de Chile, California – Oregon y Namibia – Sudáfrica. *Revista de Biología Marina* 25(1): 65-80.
- **Pequeño G. 1989.** Peces de Chile Lista sistemática revisada y comentada. *Revista de Biología Marina* 24(2): 1-132.
- **Pequeño G. 1997.** Peces de Chile Lista sistemática revisada y comentada: *Addendum*. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 32(2): 77-94.
- **Pequeño G. 2000.** Delimitaciones y relaciones biogeográficas de los peces del Pacífico suroriental. *Estudios Oceanológicos* 19: 53 – 76.
- **Rasmussen AS & U Arnson. 1999a.** Phylogenetic studies of complete mitochondrial DNA molecules place cartilaginous fishes within the tree of bony fishes. *Journal of Molecular Evolution* 48: 118- 123.
- **Rasmussen AS & U Arnson. 1999b.** Molecular studies suggest that cartilaginous fishes have a terminal position in the piscine tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences, EEUU.* 96: 2177 - 2182.
- **Rojas JR & G Pequeño.** 1998 Peces serránidos de la isla Alejandro Selkirk, Archipiélago Juan Fernández, Chile (Pises: Serranidae): Análisis ictiogeográfico. *Investigaciones Marinas, Valparaíso* 26: 41-58.

- **Romer AS. 1966.** Anatomía comparada (Vertebrados). Editorial Interamericana S. A. Tercera edición. 425 pp.
- **Ruhnke T, S Curran & T Holbert. 2000.** Two new species of *Duplicibothrium* (Tetraphyllidea: Serendipidae) from the Pacific cownose ray, *Rhinoptera steindachneri*. *Systematic Parasitology*, 47: 135-143.
- **Ruhnke T. 1996.** Taxonomic resolution of *Phyllobothrium* van Beneden (Cestoda: Tetraphyllidea) and a description of a new species from the leopard shark *Triakis semifasciata*.
- **SERNAPesca. 2001.** Anuario estadístico de pesca. Servicio Nacional de Pesca. Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción, Gobierno de Chile. 140 pp.
- **Shivji M, S Clarke, M Pank, L Natanson, N Kohler & M Stanhope. 2002.** Genetic Identification of pelagic shark body parts for conservation and trade monitoring. *Conservation Biology* 16(4): 1036 – 1047.
- **Sielfeld W & M Vargas. 1992.** Tiburones y rayas del Pacífico Sudoriental. Departamento Ciencias del Mar Universidad Arturo Prat, Chile. 135 pp.
- **Smith P & P Benson. 2001.** Biochemical identification of shark fins and fillets from the coastal fisheries in New Zealand. *Fishery Bulletin* 99: 351 – 355.

- **Suriano DM & JB Labriola. 2001.** A new Orygmatobothrium Diesing, 1863 (Eucestoda, Tetraphyllidea) parasite of *Mustelus schmitti* Springer 1939 (Carcharhiniformes, Triakidae) from the southwestern Atlantic Ocean. *Zoosystema* 23 (4):669-674.
- **Wardle RA & JA McLeod. 1952.** The zoology of tapeworms. Hafner Publishing Company. Nueva York y Londres. 780 pp.
- **Williams HH, K Mc Kenzie & AM Mc Carthy. 1992.** Parasites as biological indicators of the population biology, migrations, diet, and phylogenetics of fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 2: 144-176.